



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/02, C12P 21/08, G01N 33/531</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/60112</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年11月25日 (25.11.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/02650  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年5月20日 (20.05.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/140293 1998年5月21日 (21.05.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 松本寛和(MATSUMOTO, Hirokazu)(JP/JP) 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1204号 Ibaraki, (JP) 北田千恵子(KITADA, Chieko)(JP/JP) 〒590-0073 大阪府堺市南向陽町1丁目2番8号 Osaka, (JP) 日沼州司(HINUMA, Shuji)(JP/JP) 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1402号 Ibaraki, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHINA, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書
<b>(54) Title: ANTIBODIES AND UTILIZATION THEREOF</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 抗体およびその用途  <b>(57) Abstract</b> Monoclonal antibodies (in particular, P2L-1Ca) against 19P2 ligand having an extremely high avidity and being capable of neutralizing the arachidonic acid metabolite-releasing activity of the 19P2 ligand. Thus, these antibodies are usable in diagnostics, preventives, remedies, etc. for various diseases in association with abnormalities in the pituitary function regulatory mechanism (for example, promotion of the prolactin secretion), the central nerve regulatory mechanism, the pancreatic function regulatory mechanism, etc. The 19P2 ligand or its derivatives can be specifically quantitated at a high sensitivity by an immunoassay method based on the sandwich method with the use of the above-mentioned monoclonal antibodies (in particular, the sandwich method with the use of the monoclonal antibody together with an antibody recognizing the intermediate part of the 19P2 ligand). This quantitating method is usable in clarifying the physiological functions of the 19P2 ligand or its derivative.		

(57)要約

本発明の19P2リガンドに対するモノクローナル抗体(特に、P2L-1Ca)は、極めて高い結合能を有し、かつ19P2リガンドのアラキドン酸代謝物放出活性を中和することが出来る。従って、19P2リガンドが有すると考えられる下垂体機能調節作用(例えば、プロラクチン分泌促進作用)、中枢神経調節作用、脾臓機能調節作用などに、異常がある場合の各種疾患の診断薬、予防薬、治療薬などに用いることができる。

本発明のモノクローナル抗体を用いるサンドイッチ法(特に、該モノクローナル抗体と19P2リガンドの中間部を認識する抗体とを用いるサンドイッチ法)による免疫学的測定法により、19P2リガンドまたはその誘導体を高感度かつ特異的に定量することができる。この定量方法は19P2リガンドまたはその誘導体の生理機能の解明に用いることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JT 日本	NO ノールウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明 細 書

## 抗体およびその用途

## 5 技術分野

本発明は、19P2リガンドまたはその誘導体に結合特異性を有する新規なモノクローナル抗体に関する。更に詳しくは、抗原抗体反応に基づく19P2リガンドまたはその誘導体の定量法の開発、および、中和活性を利用して19P2リガンドまたはその誘導体に関与する疾患の診断あるいは予防・治療剤の開発に有用な抗体に関する。

10

## 背景技術

19P2リガンドは、オーファンG蛋白質共役型レセプター(19P2)に対するリガンドとして見出された新規ペプチドであり、脳(特に視床下部)に最も多く存在し、またそのレセプターである19P2が下垂体に最も多く局在することから、新規の視床下部ホルモン(15 向下垂体性ホルモン)の一つであると考えられている。また、19P2リガンドは、その配列から(1)31残基よりなる19P2-L31(31個のアミノ酸からなるペプチド)と、(2)12番目のThrより始まる19P2-L20(20個のアミノ酸からなるペプチド)の存在が推測されている(WO97/24436)。

[以下、31個のアミノ酸からなる19P2リガンドを、19P2リガンド(1-31)、20 または、19P2-L31と呼び、20個のアミノ酸からなる19P2リガンドを、19P2リガンド(12-31)、または、19P2-L20と呼ぶ場合もある。]

ウシ、ヒトおよびラットの19P2リガンド(1-31)のアミノ酸配列を以下に示す。

[ウシ19P2リガンド(1-31)] (配列番号: 1)

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-

25 Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

[ヒト19P2リガンド(1-31)] (配列番号: 2)

H-Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-  
Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

〔ラット 19P2 リガンド (1-31)〕 (配列番号: 3)

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Thr-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-  
5 Tyr-Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

ウシ、ヒトおよびラットの 19P2 リガンド (12-31) のアミノ酸配列を以下に示す

〔ウシ 19P2 リガンド (12-31)〕 (配列番号: 12)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-  
10 Phe-NH<sub>2</sub>

〔ヒト 19P2 リガンド (12-31)〕 (配列番号: 5)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-  
Phe-NH<sub>2</sub>

〔ラット 19P2 リガンド (12-31)〕 (配列番号: 13)

15 H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-  
Phe-NH<sub>2</sub>

下垂体ホルモンの調節因子である視床下部ホルモンの異常は様々な病態と関連している。  
視床下部ホルモンの一つと考えられる 19P2 リガンドは、下垂体ホルモンが関与する何ら  
かの作用を有すると考えられるが、その生理機能についてはまだ未解明な部分が多い。従っ  
20 て、19P2 リガンドの生理作用を解明するために、19P2 リガンドを簡便かつ高感度に  
検出・定量する測定系が切望されていた。

#### 発明の開示

本発明は、19P2 リガンドまたはその誘導体を感度よく特異的に定量することができる  
25 モノクローナル抗体、および該抗体を用いる 19P2 リガンドまたはその誘導体の検出・定  
量法を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、19P2リガンドまたはその誘導体の異なる部分を特異的に認識する複数のモノクローナル抗体を作製し、これら抗体を用いることにより19P2リガンドまたはその誘導体の高感度の優れた検出・定量法を開発した。さらに研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

5 即ち、本発明は、19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）、19P2リガンドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、該抗体およびハイブリドーマ細胞の製造法、該抗体を用いた競合法あるいはサンドイッチ法による19P2リガンドおよびその誘導体の免疫測定法などに関する。

さらに詳しくは、本発明者らは〔Cys<sup>17</sup>〕19P2リガンド（17-31）および〔Cys<sup>25</sup>〕19P2リガンド（12-25）を免疫原として、モノクローナル抗体を複数作製し、これらを組み合わせることにより、19P2リガンドまたはその誘導体を高感度にかつ特異的に検出し得る免疫測定法を開発した。即ち、ウシチログロブリン（BTG）と〔Cys<sup>17</sup>〕19P2リガンド（17-31）および〔Cys<sup>25</sup>〕19P2リガンド（12-25）との複合体を免疫原として19P2リガンド（1-31）またはその誘導体のC端部および中間部を認識するモノクローナル抗体、例えばP2L-1CaおよびP2L-1Taを確立した。これらの抗体は、西洋ワサビパーオキシダーゼ（HRP）標識化した〔Cys<sup>17</sup>〕19P2リガンド（17-31）および〔Cys<sup>25</sup>〕19P2リガンド（12-25）を用いる競合法免疫測定法では、この2種類のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、19P2-L31および19P2-L20に対して極めて高感度なサンドイッチ-免疫測定法を与えることが明らかとなった。本発明により、19P2リガンドを簡便にかつ高感度に測定することが可能となり、生体成分中の19P2リガンドの変動をモニターすることによりその生理機能の解明に大いに役立つものと思われる。

25 即ち、本発明は、

（1）19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノ

クローナル抗体、

(2) マウス IgG である上記 (1) 記載のモノクローナル抗体、

(3) P 2 L - 1 C a または P 2 L - 2 C a で標示される上記 (2) 記載のモノクローナル抗体、

5 (4) 1 9 P 2 リガンドまたはその誘導体の中間部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体、

(5) マウス IgG である上記 (4) 記載のモノクローナル抗体、

(6) P 2 L - 1 T a で標示される上記 (5) 記載のモノクローナル抗体、

(7) 上記 (1) または上記 (4) 記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする被  
10 検液中の 1 9 P 2 リガンドまたはその誘導体の定量法、

(8) 上記 (1) 記載の抗体と上記 (4) 記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする被検液中の 1 9 P 2 リガンドまたはその誘導体の定量法、および、

(9) 上記 (1) または上記 (4) 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞などに関する。

15 さらに、本発明は、

(10) 配列番号：7 で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする 1 9 P 2 リガンドまたはその誘導体の C 端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とするモノクローナル抗体、

(11) 配列番号：11 で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特  
20 徴とする 1 9 P 2 リガンドまたはその誘導体の中間部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とするモノクローナル抗体、

(12) 上記 (10) または上記 (11) 記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の 1 9 P 2 リガンドまたはその誘導体の定量法、

(13) 上記 (11) 記載の抗体と、上記 (10) 記載の抗体を用いることを特徴とする被  
25 検液中の 1 9 P 2 リガンドまたはその誘導体の定量法、

(14) 高プロラクチン血症の診断に用いられる上記 (12) または (13) 記載の定量法

などに関する。

上記（１）記載のモノクローナル抗体の好ましい態様としては、

（i）１９Ｐ２リガンドが配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号５または配列番号：１２で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記（１０）記載のモノクローナル抗体、

（ii）１９Ｐ２リガンドの誘導体が①配列番号：７で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：１、配列番号：２または配列番号：３で表されるアミノ酸配列の第１８番目～３１番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってＣ端がアミドであるペプチド、③配列番号：５または配列番号：１２で表されるアミノ酸配列の第８番目～２０番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは④配列番号：１～配列番号：７、配列番号：１０または１１で表されるアミノ酸配列のＣ末端の９残基のアミノ酸配列を有するペプチドである第（１０）記載のモノクローナル抗体、

（iii）１９Ｐ２リガンドまたはその誘導体のＣ端側の部分ペプチドが、１９Ｐ２リガンドのＮ端のアミノ酸から数えて２０番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドである上記（１０）記載のモノクローナル抗体、

（iv）抗体が配列番号：９で表されるＣ末端がカルボン酸となったアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする上記（１０）記載のモノクローナル抗体、

（v）抗体が配列番号：７で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：８で表されるアミノ酸配列を認識しないことを特徴とする上記（１０）記載のモノクローナル抗体、

（vi）配列番号：７で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：１０で表されるＣ末端のPheが欠けたアミノ酸配列を有するペプチドを認識しないことを特徴とする上記（１０）記載のモノクローナル抗体、

（vii）Ｐ２Ｌ－１ＣａまたはＰ２Ｌ－２Ｃａで標示される上記（１０）記載のモノクローナル抗体、

（viii）配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：５および配列番号：１２

で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに対して中和活性を有する上記（１０）記載のモノクローナル抗体などがあげられる。

上記（４）記載のモノクローナル抗体の好ましい態様としては、

5 (i) １９Ｐ２リガンドが配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：５または配列番号：１２で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記（１１）記載のモノクローナル抗体、

(ii) １９Ｐ２リガンドの誘導体が①配列番号：１で表されるアミノ酸配列の第１２番目～  
24番目のアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：２で表されるアミノ酸配列の第  
12番目～24番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは③配列番号：３で表されるアミノ  
10 酸配列の第１２番目～24番目のアミノ酸配列を有するペプチドである上記（１１）記載の  
モノクローナル抗体、

(iii) 配列番号：４または配列番号：６で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを認識し  
ない上記（１１）記載のモノクローナル抗体、

(iv) P2L-1TaまたはP2L-3Taで標示される上記（１１）記載のモノクローナ  
15 ル抗体などがあげられる。

また、好ましいハイブリドーマ細胞として、

(i) 上記（１０）または（１１）記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞  
などがあげられる。

上記（１２）記載の定量法の好ましい態様としては、

20 (i) 上記（１０）または上記（１１）記載のモノクローナル抗体と、被検液および標識化  
１９Ｐ２リガンドまたはその誘導体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化１９Ｐ  
２リガンドまたはその誘導体の割合を測定することを特徴とする被検液中の１９Ｐ２リガンド  
またはその誘導体の定量法などがあげられる。

上記（１３）記載の定量法の好ましい態様としては、

25 (i) 担体上に不溶化した１９Ｐ２リガンドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された  
１９Ｐ２リガンドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させた後、不溶化担体上



の標識剤の活性を測定することを特徴とし、担体上に不溶化した19P2リガンドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された19P2リガンドまたはその誘導体に対する抗体の一方が上記(10)記載のモノクローナル抗体であり、他方が上記(11)記載のモノクローナル抗体であることを特徴とする被検液中の19P2リガンドまたはその誘導体の定量法、

(ii) 上記(11)記載のモノクローナル抗体がP2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体である上記(i)記載の定量法、

(iii) 担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドに対する抗体の一方がP2L-1CaまたはP2L-2Caで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体である上記(i)記載の定量法、

(iv) 担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドに対する抗体の一方がP2L-1Caで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-2Ca、P2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体であり、19P2リガンドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、および(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記(i)記載の定量法、

(v) 担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドに対する抗体の一方がP2L-2Caで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-1Ca、P2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体であり、19P2リガンドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するペプチドおよび(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記(i)記載の定量法、

(vi) 担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドに対する抗体の一方がP2L-1Taで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-1CaまたはP2L-2Caで標示されるモノクローナル抗体であり、19P2リガンドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドおよび（または）配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記(i)記載の定量法などがあげられる。

本発明における19P2リガンドとしては、アミノ酸31残基からなる19P2リガンド（1-31）とアミノ酸20残基からなる19P2リガンド（12-31）がある。例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド（1-31）、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド（1-31）、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド（1-31）、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド（12-31）または配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド（12-31）などが用いられる。

本発明における19P2リガンドの誘導体としては、例えば、上記19P2リガンドのN端部のアミノ酸がそれぞれ16ないし17残基程度欠落したもの、C端部のアミノ酸が1残基欠落したもの、L-グリシンをD-アラニンに置換したもの、C末端アミドをカルボン酸に変換したもの、C端側にL-グリシンとL-アルギニンを付加したもの、L-システインを付加したもの、N端部にアセチル基を有するものなどが用いられる。具体的には、①19P2-L31のアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列が欠如した配列番号：4で表されるペプチド、②配列番号：4で表されるペプチドのN末端にアセチル基が付加した配列番号：6で表されるペプチド、③19P2-L31のアミノ酸配列の第29番目のグリシンがD-アラニンに変換した H-Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-D-Ala-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

で表されるペプチド、④19P2-L31のC端側にL-グリシンとL-アルギニンを付加した配列番号：8で表されるペプチド、⑤19P2-L31のアミノ酸配列のC末端アミドをカルボン酸に変換した配列番号：9で表されるペプチド、⑥19P2-L31のアミノ酸配列の第31番目のPheが欠如した配列番号：10で表されるペプチドなどが用いられる

5 。

これらの19P2リガンドまたはその誘導体は、(a)例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物から自体公知の方法で調製することもできるし、(b)ペプチド・シンセサイザー等を使用する自体公知のペプチド合成方法で化学的に合成することもできる。

本発明における19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドとしては、配列番号：7で表されるアミノ酸配列の第18番目～31番目のアミノ酸配列を有するペプチドであって、そのN端にシステインが付加したペプチドが挙げられる。

本発明における19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）としては、例えば19P2リガンドまたはその誘導体を認識する抗体などが用いられる。

15 より具体的には、これらの抗体の中でも、

(i) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち、19P2リガンド（18-31））を認識するが、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち、19P2リガンド（12-24））を認識しない抗体、

(ii) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち、19P2リガンド（18-31））を認識し、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち、19P2リガンド（12-24））を認識する抗体が挙げられる。

上記(i)、(ii)の抗体のなかでも、マウスIgGであるもの、さらには抗体のサブクラスが $\kappa$ であるものが好ましく用いられる。

上記(i)の抗体の中でも、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド（1-31）、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド（1-31）、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド（

25

1-31)、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(12-31)および(または)配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(12-31)を特異的に認識する抗体がより好ましく、さらには H-Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-

5 Gly-Ile-Arg-Pro-Val-D-Ala-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド [D-Ala<sup>29</sup>] (1-31) を認識するが、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(1-30)、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)-OH、配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)-Gly-Ala-OH を認識しない抗体が好ましい。

10 また、上記(ii)の抗体の中でも、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(1-31)、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド(1-31)および(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(12-31)を特異的に認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：10  
15 で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(1-30)および配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)-Gly-Ala-OH を認識する抗体が好ましい。

上記(i)の抗体の代表例としては、P2L-1Caで標示されるモノクローナル抗体があり、上記(ii)の抗体の代表例としては、P2L-2Caで標示されるモノクローナル抗  
20 体が挙げられる。

次に、本発明における19P2リガンドまたはその誘導体の中心部の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識せず、配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする19P2リガンドまたはその誘導体に特異的に反応するモノクローナル抗体などが用いられる。これら抗体のなかでも、配列番号：1で表されるア  
25 ノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)、配列番号：2で表されるアミノ酸配

列を有するヒト19P2リガンド（1-31）、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド（1-31）、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド（12-31）、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド（12-31）、および（または）配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド（12-31）を特に認識する抗体が好ましく、配列番号：4または配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドを認識しない抗体が好ましい。なかでも、マウスIgGであるもの、さらには抗体のサブクラスが $\kappa$ であるものが好ましく用いられる。具体的には、P2L-1Ta、P2L-2Ta、P2L-3TaまたはP2L-4Taで標示されるモノクローナル抗体などが用いられる。これらモノクローナル抗体のなかでも、特にP2L-1Taなどが好適である。

以下に、本発明におけるモノクローナル抗体の抗原の調製方法、および該モノクローナル抗体の製造方法について詳細に説明する。

#### （1）抗原の調製

本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えば19P2リガンドまたはその誘導体、19P2リガンドと同一の抗原決定基を1種あるいは2種以上有する合成ペプチドなど何れのものも使用することができる（以下、これらを単に19P2リガンド抗原と称することもある）。

該19P2リガンドまたはその誘導体としては、前述したものなどが用いられる。これら19P2リガンドまたはその誘導体は、（a）例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物の組織または細胞から自体公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製することもできるし、（b）ペプチド・シンセサイザー等を使用する自体公知のペプチド合成方法で化学的に合成することもできる。また、（c）該19P2リガンドまたはその誘導体は、それをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

（a）該哺乳動物の組織または細胞から調製する場合、その組織または細胞をホモジナイ

ズした後、酸、またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

(b) 化学的に合成する場合、該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製した19P2リガンド抗原と同一の構造を有するものや、19P2リガンド(1-31)などのアミノ酸配列において3個以上、好ましくは6個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を1種あるいは2種以上含有するペプチド(以下19P2リガンド関連合成ペプチドと略す)などが用いられる。

(c) DNAを含有する形質転換体を用いて該19P2リガンドまたはその誘導体を製造する場合、そのリガンドまたはその誘導体をコードするDNAは、公知のクローニング方法[例えば、Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法など]に従って作成することができる。該クローニング方法とは、(1) 該ペプチドのアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプローブまたはDNAプライマーを用い、cDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法により該ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法、または(2) 該ペプチドのアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、PCR法により該ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法などが挙げられる。

上記したように該抗原としてのペプチドは、(1) 自体公知のペプチドの合成法に従って、または(2) 本発明のペプチドを含有するペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

該ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、該ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～②に記載された方法等が挙げられる。

① M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis)

is), Interscience Publishers, New York (1966 年)

② Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて該ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

ペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM 樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル) フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmoc アミノエチル) フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のペプチドを取得する。あるいはクロロトリチル樹脂、オキシム樹脂、4-ヒドロキシ安息香酸系樹脂等を用い、部分的に保護したペプチドを取り出し、更に常套手段で保護基を除去し目的のペプチドを得ることもできる。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤 (例えば、HOBt、HOOBt など) とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物または HOBt エステルあるいは HOOBt エステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を

行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~約50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常約1.5ないし約4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばC<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、C<sub>7-14</sub>アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級(C<sub>1-6</sub>)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エト



キシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

5 チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえば Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmoc などが挙げられる。

10 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

15 保護基の除去 (脱離) 方法としては、たとえば Pd 黒あるいは Pd 炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に -20℃~40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール  
20 、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる 2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の 1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外  
25 に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、

反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

- 10 ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

19P2リガンド抗原は、凝集しやすいため、不溶化したものを直接免疫することもできる。また、該19P2リガンド抗原を適当な担体に結合または吸着させた複合体を免疫してもよい。該担体および担体（キャリアー）と19P2リガンド抗原（ハプテン）との混合比は、担体に結合あるいは吸着させた19P2リガンド抗原に対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテン抗原に対する抗体の作製にあたり常用されている天然もしくは合成の高分子担体を重量比でハプテン1に対し0.1～100の割合で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。

- 20 天然の高分子担体としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のチログロブリン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが用いられる。合成の高分子担体としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または供重合物などの各種ラテックスなどを用いることができる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例

例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同志を架橋するグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2, 4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同志を架橋するN, N'-o-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えば、SPDPなど）を反応させた後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

## 10 (2) モノクローナル抗体の作製

19P2リガンド抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられるが、モノクローナル抗体作製にはマウス、ラットなどが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体の作製に際しては、19P2リガンド抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、抗19P2リガンドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗19P2リガンド抗体価の測定は、例えば後記の標識化19P2リガンドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGなどが用いられる。骨髓腫細胞

胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1などが好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄細胞数との好ましい比率は、通常1:1~20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、通常20~40℃、好ましくは30~37℃で通常1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗19P2リガンド抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば19P2リガンドあるいは19P2リガンド関連合成ペプチドを直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗19P2リガンドモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した19P2リガンドを加え、固相に結合した抗19P2リガンドモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗19P2リガンドモノクローナル抗体のスクリーニング、育種は通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加して、10~20%牛胎児血清を含む動物細胞用培地（例、RPMI1640）で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗19P2リガンド抗体価の測定と同様にして測定できる。

抗19P2リガンドモノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など〕に従って行われる。

また、19P2リガンドの一部領域と反応する抗19P2リガンド抗体を産生するハイブリドーマおよび、19P2リガンドとは反応するがその一部領域とは反応しない抗19P2

リガンドモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングはたとえばその一部領域に相当するペプチドとハイブリドーマが産生する抗体との結合性を測定することにより行うことができる。

以上のようにして得られる①P 2 L - 1 C aで標示されるモノクローナル抗体、②P 2 L - 3 C aで標示されるモノクローナル抗体および③1 9 P 2リガンドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体P 2 L - 3 T aで標示されるモノクローナル抗体は、それぞれ1 9 P 2リガンドのC端側および中心部分の部分ペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の1 9 P 2リガンドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

10 即ち、本発明は、

(1) 本発明の1 9 P 2リガンドまたはその誘導体に対する抗体と、被検液および標識化1 9 P 2リガンドまたはその誘導体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化1 9 P 2リガンドまたはその誘導体の割合を測定することを特徴とする被検液中の1 9 P 2リガンドまたはその誘導体の定量法、

15 (2) 担体上に不溶化した1 9 P 2リガンドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された1 9 P 2リガンドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の1 9 P 2リガンドまたはその誘導体の定量法であって、担体上に不溶化した1 9 P 2リガンドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された1 9 P 2リガンドまたはその誘導体に対する抗体の一方が1 9 P 2リ  
20 ガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体であり、他方が配列番号：1 1で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち1 9 P 2リガンド（1 2 - 2 4））などの1 9 P 2リガンドまたはその誘導体の中間部分を認識する抗体である定量法などを提供する。

より具体的には、1 9 P 2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に  
25 反応することを特徴とする抗体がP 2 L - 1 C aまたはP 2 L - 2 C aで標示されるモノクローナル抗体であり、配列番号：1 1で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち

、19P2リガンド（12-24））などの19P2リガンドまたはその誘導体の中間部分を認識する抗体がP2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体である。

上記の定量法（2）の中でも、特に、

- 5 ①担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドまたはその誘導体に対する抗体の一方がP2L-1Caで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体であり、19P2リガンドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法、
- 10 ②担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドまたはその誘導体に対する抗体の一方がP2L-2Caで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体であり、19P2リガンドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法などが好適である。
- 15 以下に本発明の19P2リガンドまたはその誘導体（以下、19P2リガンドと略称する）の定量法（免疫測定法）について、より詳細に説明する。

- 本発明の抗体は19P2リガンドを認識することができるので、19P2リガンドの測定あるいは組織染色などによる検出を行なうことができる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また抗体分子のF（ab'）<sub>2</sub>、Fab'あるいはFab画分などを用
- 20 いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、19P2リガンド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、
  - 25 、感度、特異性の点で後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質

、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば  $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$  などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが、蛍光物質としては、例えばフルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、例えばルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは 19P2 リガンドと標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えばアガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコンなどの合成樹脂あるいはガラスなどが挙げられる。

サンドイッチ法においては、不溶化した抗 19P2 リガンド抗体に被検液を反応（1 次反応）させ、さらに標識化抗 19P2 リガンド抗体を反応（2 次反応）させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の 19P2 リガンド量を定量することができる。1 次反応と 2 次反応は同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも 1 種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で 2 種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による 19P2 リガンドの測定法においては、1 次反応と 2 次反応に用いられる抗 19P2 リガンド抗体とは 19P2 リガンドの該抗体と結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、例えば 1 次反応で用いられる抗体が 19P2 リガンドの C 端側の部分ペプチドを認識する場合は、2 次反応で用いられる抗体は、好ましくは C 端側の部分ペプチド以外（即ち、N 端側または中間部の部分ペプチド）を認識する抗体が用いられる。

具体的に、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる 19P2 リガンドの C 端側の部

分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、[Cys<sup>17</sup>] ヒト19P2リガンド(17-31)を免疫原として作製したモノクローナル抗体が用いられる。本発明者らは、このような抗体を産生するハイブリドーマを8種類確立した。中でもハイブリドーマP2L-1Cが産生する抗体は、後述するパーオキシダーゼ標識化19P2リガンド(17-31)を用いる競合法の酵素免疫測定法において、ヒト、ウシおよびラット19P2リガンド(1-31)と反応した(B/B<sub>0</sub>=0.5を与える抗原濃度: 3 nM, 1.1 ng/well)。さらに、後述する[Cys<sup>25</sup>] 19P2リガンド(12-25)を免疫原として作製した19P2リガンドの中間部の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体のうち、特にP2L-1Taと組み合わせたサンドイッチ法に用いた場合、予想外にも19P2リガンドをより高感度に測定できることが明らかとなった(検出感度、0.1 fmol/well)。即ち、本発明のサンドイッチ法酵素免疫測定法に適した19P2リガンドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体は、必ずしも19P2リガンド(1-31)に対して高親和性である必要はない。このような抗体として、例えば、P2L-1Taなどが好都合に用いられる。

一方、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる19P2リガンドの中間部の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体としては、[Cys<sup>25</sup>] 19P2リガンド(12-25)を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを12種類作製した(表2)。これらの抗体の19P2リガンド(12-25)に対する反応性を後述するパーオキシダーゼ標識化19P2リガンド(12-25)を用いる競合法により調べたところ、4種類の抗体が19P2リガンド(12-25)に良好な反応性を有していた(B/B<sub>0</sub>=0.5を与える抗原濃度: 1~4 nM, 0.9~1.6 ng/well)が、P2L-1TaとP2L-3Taが19P2リガンド(1-31)に良好な反応性を有していた。そのなかでも特にP2L-1Taが極めて高感度のサンドイッチ測定法を与えることが明らかとなった。また、P2L-1Taは19P2リガンド(12-31)とも同程度の反応性を示した。即ち、本発明において、サンドイッチ法に適した19P2リガンドの中間部の部分ペプチドを認識する抗体として、19P2リガンド(12-2



4) に対する抗体を数種類提供するが、特に P 2 L - 1 T a が好適に用いられる。

本発明のモノクローナル抗体は、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法、ネフロメトリーなどにも用いることもができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原 (F) と抗体と結合した標識抗原 (B) とを分離し (B/F 分離)、B および F いずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F 分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第 2 抗体などを用いる液相法や、第 1 抗体として固相化抗体を用いるかあるいは第 1 抗体は可溶性のものを用い、第 2 抗体として固相化抗体を用いる固相化法などが用いられる。

10 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて 1 9 P 2 リガンドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる [例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和 4 9 年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和 5 4 年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和 5 3 年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第 2 版)(医学書院、昭和 5 7 年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第 3 版)(医学書院、昭和 6 2 年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84

(Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行) など参照]。したがって、

- 5 本発明のサンドイッチ免疫測定法により 19P2 リガンドの測定系を構築する場合、その方法は後述する実施例に限定されない。

以上のように、本発明の抗体は、19P2 リガンドまたはその誘導体を感度良く定量することができるので、19P2 リガンドの生理機能の解明および 19P2 リガンドの関与する病態の診断等として有用である。

- 10 本発明の明細書において、アミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければ L-体を示すものとする。

PAM : フェニルアセタミドメチル

- 15 Boc : t-ブチルオキシカルボニル

Fmoc : 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル

Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル

Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル

Bzl : ベンジル

- 20 Cl<sub>2</sub>-Bzl : 2,6-ジクロロベンジル

OHx : シクロヘキシルエステル

OBzl : ベンジルエステル

Tos : p-トルエンシルボニル

HONB : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド

- 25 HOBt : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

HOObt : 3-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリア

ジン

MeBzl : 4-メチルベンジル

Bom : ベンジルオキシメチル

Bum : *t*-ブトキシメチル

5 Trt : トリチル

DNP : ジニトロフェニル

TFA : トリフルオロ酢酸

DMF : N、N-ジメチルフォルムアミド

DCM : ジクロロメタン

10 DCC : N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

BHA : ベンズヒドリルアミン

pMBHA : *p*-メチルベンズヒドリルアミン

CHO : ホルミル

DEA : ジイソプロピルエチルアミン

15 2Ac-ヒト19P2リガンド : [AcPro17, Tyr(Ac)20]ヒト19P2リガンド (17-31)

Gly : グリシン

Ala : アラニン

Val : バリン

Leu : ロイシン

20 Ile : イソロイシン

Ser : セリン

Thr : スレオニン

Cys : システイン

Met : メチオニン

25 Glu : グルタミン酸

Asp : アスパラギン酸

L y s : リジン  
A r g : アルギニン  
H i s : ヒスチジン  
P h e : フェニルアラニン  
5 T y r : チロシン  
T r p : トリプトファン  
P r o : プロリン  
A s n : アスパラギン  
G l n : グルタミン

10 本明細書において用いられる配列番号は、以下のペプチドのアミノ酸配列を表す。

〔配列番号：1〕 ウシ19P2リガンド（1-31）

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

〔配列番号：2〕 ヒト19P2リガンド（1-31）

15 H-Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

〔配列番号：3〕 ラット19P2リガンド（1-31）

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Thr-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

20 〔配列番号：4〕 ヒト19P2リガンド（17-31）

H-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

〔配列番号：5〕 ヒト19P2リガンド（12-31）

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-

Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

25 〔配列番号：6〕 ヒト19P2リガンド（17-31）のジアセチル体

Ac-Pro-Ala-Trp-Tyr (Ac)-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

〔配列番号：7〕 [Cys<sup>17</sup>] ヒト19P2リガンド (17-31)

H-Cys -Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

〔配列番号：8〕 ウシ19P2リガンド (1-31) Gly-Arg-OH

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-

5 Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-Gly-Arg-OH

〔配列番号：9〕 ウシ19P2リガンド (1-31) -OH

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-OH

〔配列番号：10〕 ヒト19P2リガンド (1-30)

10 H-Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-NH<sub>2</sub>

〔配列番号：11〕 [Cys<sup>25</sup>] ヒト19P2リガンド (12-25)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>

〔配列番号：12〕 ウシ19P2リガンド (12-31)

15 H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-

Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

〔配列番号：13〕 ラット19P2リガンド (12-31)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-

Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

20 後述の実施例で得られた抗19P2リガンド抗体を産生するハイブリドーマ細胞のうち、  
P2L-1CおよびP2L-1Tは平成10年3月18日から通商産業省工業技術院生命工  
学技術研究所 (NIBH) に、それぞれ以下の受託番号で寄託されている。

ハイブリドーマ細胞

FERM-BP (NIBH)

P2L-1C

6299

25

P2L-1T

6300

なお、各ハイブリドーマ細胞から得られる抗体については細胞名の後に a を付けた形で表

す。

以下に、実験例を含む実施例を示し、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

〔実施例1〕 抗原の作成

5 (1) 19P2リガンドの製造

実験例1 ウシ19P2リガンド(1-31)の製造

1) Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Ala-His(Bom)-Gln-His(Bom)-Ser(Bzl)-Met-Glu(OcHex)-Ile-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin の合成。

- 10 市販のp-メチルBHA樹脂(アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製) 0.71g(0.5mmole)をペプチド合成機(アプライド バイオシテムズ社製430A)の反応器に入れ、ジクロロメタン(DCM)で膨潤させた後、最初のアミノ酸 Boc-Phe を HOBt/DCC 法で活性化しp-メチルBHA樹脂に導入した。樹脂を 50%TFA/DCMで処理し、Boc基を除去してアミノ基を遊離させ、ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)で中和した。この
- 15 アミノ基に次のアミノ酸 Boc-Arg(Tos)を HOBt/DCC 法で縮合した。未反応アミノ基の有無をニンヒドリンテストで調べ反応完了を確認後同様に、Boc-Gly, Boc-Val, Boc-Pro, Boc-Arg(Tos), Boc-Ile, Boc-Gly, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Ala, Boc-Tyr(Br-Z)を順次縮合、ニンヒドリンテストで縮合が不十分であると判明した Boc-Ala, Boc-Tyr(Br-Z)は再縮合し反応を完了した。樹脂を乾燥して半量の樹脂を取り出した残りに、Boc-Trp(CHO), Boc-Ala,
- 20 Boc-Pro, Boc-Asn, Boc-Ile, Boc-Asp(OcHex), Boc-Pro, Boc-Thr(Bzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Ile, Boc-Glu(OcHex), Boc-Met, Boc-Ser(Bzl), Boc-His(Bom), Boc-Gln, Boc-His(Bom), Boc-Ala, Boc-Arg(Tos), Boc-Ser(Bzl)を同様にニンヒドリンテストで十分な縮合が得られるまで再縮合をくり返した。全配列アミノ酸が導入され樹脂を 50%トリフルオロ酢酸(TFA)/DCMで処理し樹脂上の Boc 基を除去後、樹脂を乾燥し 1.28g のペプチド樹脂を合成した。
- 25 2) Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> の合成。

1) で得た樹脂を p-クレゾール 3.8g、1,4-ブタンジチオール 1 ml、弗化水素 10ml と共にテフロン製弗化水素反応装置中で 0℃ 60 分間反応した。弗化水素、1,4-ブタンジチオール 1 ml を減圧留去し、残留物にジエチルエーテル 100ml を加え攪拌後、ガラスフィルター上に濾取、乾燥した。これを 50%酢酸水溶液 50ml 中に懸濁、攪拌し、ペプチドを抽出した後樹脂と分離し減圧下に約 5 ml までに濃縮した後、セファデックス G-25 (2 x 90 cm) のカラムに付し 50%酢酸水で展開し 114 ml~181 ml の画分を集め凍結乾燥し、白色粉末 290 mg を得た。これを LiChroprep (RP-18 (MERCK 社製)) を充填した逆相系カラムにつけ 0.1% TFA 水と 0.1% TFA 含有 30% アセトニトリル水溶液を用いたグラジエント溶出での精製をくり返し、アセトニトリル濃度 25% 前後に溶出される部分を集め凍結乾燥し、白色粉末 71 mg を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 3574.645 (計算値 3574.847)

HPLC 溶出時間 18.2 分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A 液 (0.1% TFA 水)

B 液 (0.1% TFA 含有 50% アセトニトリル水) を用い

A 液から B 液へ直線型濃度勾配溶出 (25 分)

流速: 1.0 ml/分

## 実験例 2 ヒト 19P2 リガンド (1-31) の製造

実験例 1 と同様に p-メチル BHA 樹脂に Boc-Phe、Boc-Arg(Tos)、Boc-Gly、Boc-Val、Boc-Pro、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Gly、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Ala、Boc-Tyr(Bzl)、Boc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OcHex)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Glu(OcHex)、Boc-Met、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)、Boc-Arg(Tos)、Boc-His(Bom)、Boc-Thr(Bzl)、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl) をニンヒドリンテストで十分な縮合が得られるまで再縮合をくり返した。全配列アミノ酸が導入され樹脂を 50%

TFA/DCMで処理し樹脂上の Boc 基を除去後、樹脂を乾燥し所望のペプチド樹脂を合成した。この樹脂を実験例1と同様の弗化水素処理の後、やはり同様のクロマト精製で目的のペプチドを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 3662.884 (計算値 3662.905)

5 HPLC溶出時間 17.2分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

10 A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

### 実験例3 ラット19P2リガンド (1-31) の製造

実験例1の1回目の Boc-Ala と2回目の Boc-Ile を Boc-Thr (Bzl)に変更して合成を進め、

15 全配列アミノ酸が導入され樹脂を 50%TFA/DCMで処理し樹脂上の Boc 基を除去後、樹脂を乾燥し所望のペプチド樹脂を得た。この樹脂を実験例1と同様に処理、精製し、Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Thr-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> の、白色粉末を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 3622.547 (3622.826)

20 HPLC溶出時間 17.4分

カラム条件

カラム: Wakosil (5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

25 A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分



## 実験例4 ヒト19P2リガンド(17-31)の製造

実験例2で Boc-Tyr(Br-Z) までを縮合した樹脂にさらに Boc-Trp(CHO), Boc-Ala, Boc-Pro, を同様に縮合し、 Boc-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-  
5 Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin を得た。 これを実験例1の2)と同様に弗化水素処理、カラム精製し、白色粉末70mgを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1731.9 (計算値 1732.0)

HPLC溶出時間 16.1分

カラム条件

10 カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出(15分)

流速: 1.0 ml/分

15

## 実験例5 ヒト19P2リガンド(12-31)の製造

実験例4で Boc-Pro までを縮合した樹脂にさらに Boc-Asn, Boc-Ile, Boc-Asp(OcHex), Boc-Pro, Boc-Thr(Bzl) を同様に縮合し、 Boc-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-  
20 pMBHA-resin を得た。 これを実験例4と同様に弗化水素処理、カラム精製し、白色粉末60mgを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 2272.1260 (計算値 2272.2100)

HPLC溶出時間 16.8分

カラム条件

25 カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

5 実験例6 ヒト19P2リガンド (17-31) のジアセチル体の製造

実験例4の化合物17.5mgを10%ピリジン水に溶解し、無水酢酸20 $\mu$ lと約60分反応後、実験例4と同様に精製し、10.7mgの粉末を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1815.8600 (計算値 1815.9743)

HPLC溶出時間 19.7分

10 カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% 水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

15 流速: 1.0 ml/分

実験例7 [Cys<sup>17</sup>] ヒト19P2リガンド (17-31) の製造

実験例4の樹脂にさらに Boc-Cys (MeBzl) 縮合し、これを同様に弗化水素処理、カラム精製し、白色粉末50mgを得た。

20 質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1737.9 (計算値 1737.6)

HPLC溶出時間 17.2分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有水)

25 B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速： 1.0 ml/分

#### 実験例8 [D-Ala<sup>29</sup>] ヒト19P2リガンド (1-31) の製造

実験例2と同様にp-メチルBHA樹脂に Boc-Phe、Boc-Arg(Tos)を順に導入した後、  
5 Boc-Gly を Boc-D-Ala に代えて導入した。以後実験例2と同様に反応し、Ser(Bzl)-  
Arg(Tos)-Thr(Bzl)-His(Bom)-Arg(Tos)-His(Bom)-Ser(Bzl)-Met-Glu(OcHex)-Ile-Arg(Tos)-  
Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-  
Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-D-Ala-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin を得た。この樹脂を実験例2  
と同様に処理、精製し、Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-  
10 Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-D-Ala-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> の白色粉末を  
得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 3678.6 (計算値 3679.2)

HPLC溶出時間 18.5分

カラム条件

15 カラム：YMC-A-301-3 ODS (4.6 x 100mm)

溶離液：A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速： 1.0 ml/分

20

#### 実験例9 ウシ19P2リガンド (1-31) Gly-Arg-OH の製造

市販 Boc-Arg(Tos)-OCH<sub>2</sub>PAM 樹脂 (アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製)  
) 0.83g(0.5 mmole) をペプチド合成機 (アプライド バイオシテムズ社製430A) の反応  
器に入れ、DCMで膨潤させた後、50%TFA/DCMで処理し、Boc基を除去してアミノ基  
25 を遊離させ、DIEAで中和した。このアミノ基に次のアミノ酸 Boc-Gly を HOBt/DCC 法で縮  
合した。以後実験例1と同様の Boc アミノ酸を順次縮合し、全アミノ酸配列を導入した樹脂

1. 21 gを得た。この樹脂0.59 gを実験例1と同様に処理、精製して白色粉末162 mgを得た。

質量分析による  $(M+H)^+$  3789.0105 (計算値 3788.9477)

HPLC溶出時間 16.4分

5 カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

10 流速: 1.0 ml/分

実験例10 ウシ19P2リガンド (1-31) -OHの製造

市販 Boc-Phe-OCH<sub>2</sub>PAM 樹脂 (アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製) 0.

69 g (0.5 mmole) を用い実験例9と同様に所望するアミノ酸配列通りに順次 Boc アミノ酸

15 を導入後、処理精製を行い、白色粉末を得た。

質量分析による  $(M+H)^+$  3575.7451 (3575.8254)

HPLC溶出時間 16.6分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

20 溶離液: A液 (0.1% TFA含有水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

25 実験例11 ウシ19P2リガンド (1-30) の製造

実験例2と同様に p-メチルBHA樹脂に、Boc-Arg(Tos)、Boc-Gly、Boc-Val、Boc-Pro、

Boc-Arg(Tos), Boc-Ile, Boc-Gly, Boc-Arg(Tos), Boc-Ser(Bzl), Boc-Ala, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Trp(CH<sub>3</sub>), Boc-Ala, Boc-Pro, Boc-Asn, Boc-Ile, Boc-Asp(OcHex), Boc-Pro, Boc-Thr(Bzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Ile, Boc-Glu(OcHex), Boc-Met, Boc-Ser(Bzl), Boc-His(Bom), Boc-Arg(Tos), Boc-His(Bom), Boc-Thr(Bzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Ser(Bzl)を順次縮合した後、同様に処理精製

5 し、白色粉末を得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 3517.4 (計算値 3518.0)

HPLC溶出時間 17.5分

カラム条件

カラム: YMC-A-301-3 ODS (4.6 x 100mm)

10 溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

15 実験例12 [Cys<sup>25</sup>] ヒト19P2リガンド (12-25) の製造

実験例2と同様にp-メチルBHA樹脂に、Boc-Cys(MeBzl), Boc-Gly, Boc-Arg(Tos), Boc-Ser(Bzl), Boc-Ala, Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Trp(CH<sub>3</sub>), Boc-Ala, Boc-Pro, Boc-Asn, Boc-Ile, Boc-Asp(OcHex), Boc-Pro, Boc-Thr(Bzl), を順次縮合した後、同様に処理精製し、白色粉末を得た。

20 質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 1549.5 (計算値 1549.7)

HPLC溶出時間 15.3分

カラム条件

カラム: Wakosil(5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

25 B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速： 1.0 ml/分

### 実験例13 ウシ19P2リガンド(12-31)の製造

実験例1で Boc-Tyr(Br-Z)までを縮合した樹脂にさらに Boc-Trp(CHO), Boc-Ala, Boc-Pro,  
 5 Boc-Asn, Boc-Ile, Boc-Asp(OcHex), Boc-Pro, Boc-Thr(Bzl)を同様に縮合し、Boc-Thr(Bzl)-  
 Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-  
 Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 1.14gを得た。これを実験例1の  
 2)と同様に弗化水素処理、カラム精製し、白色粉末60mgを得た。

質量分析による (M+H)<sup>+</sup> 2242.149 (計算値 2242.200)

10 HPLC溶出時間 10.4分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有15%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有45%アセトニトリル水) を用い

15 A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (15分)

流速: 1.0 ml/分

### 〔実施例2〕免疫原の作製

(1) 19P2リガンド(18-31)を含む免疫原の作製

20 上記実施例1 (実験例7) で得られた [Cys<sup>17</sup>] 19P2リガンド(17-31)と牛チロ  
 グロブリン (BTG) との複合体を作製し、免疫原とした。即ち、BTG 20mgを、0.  
 1Mリン酸緩衝液 (pH6.5) 1.4mlに溶解させ、N-(γ-マレイミドブチリロキシ  
 )サクシニミド (GMBS) 2.2mg (8 μmol) を含むDMF溶液100 μlと混合し  
 、室温で40分反応させた。反応後、セファデックスG-25カラムで分画したのち、マレ  
 25 イミド基の導入されたBTG 15mgと [Cys<sup>17</sup>] 19P2リガンド(17-31) 1.6  
 mgとを混合し、4℃で2日間反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で2日間透析

した。

(2) 19P2リガンド(12-25)を含む免疫原の作製

上記実施例1(実験例12)で得られた[Cys<sup>25</sup>]19P2リガンド(12-25)とBTGとの複合体を作製し、免疫原とした。即ち、BTG21mgを0.1Mリン酸緩衝液(pH6.5)1.4mlに溶解させ、GMBS2.35mg(8.4 $\mu$ mol)を含むDMF溶液100 $\mu$ lと混合し、室温で40分反応させた。反応後、セファデックスG-25カラムで分画したのち、マレイミド基の導入されたBTG15mgと[Cys<sup>25</sup>]19P2リガンド(12-25)3.8mgとを混合し、4℃で一晩反応させた。反応後、生理食塩水に対し4℃で3日間透析した。

10

〔実施例3〕免疫

6～8週令のBALB/C雌マウスに上記実施例2記載の免疫原[Cys<sup>17</sup>]19P2リガンド(17-31)-BTG複合体および[Cys<sup>25</sup>]19P2リガンド(12-25)-BTG複合体を、それぞれ約20 $\mu$ g/匹を完全フロイントアジュバントとともに皮下免疫した。以後3週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュバントとともに2～3回追加免疫した。

15

〔実施例4〕酵素標識化抗原の作製

(1) 西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)標識化19P2リガンド(17-31)の作製

上記実施例1(実験例7)で得られた[Cys<sup>17</sup>]19P2リガンド(17-31)とHRP(酵素免疫測定法用、ベーリンガー・マンハイム社製)とを架橋し、酵素免疫測定法(EIA)の標識体とした。即ち、HRP6mg(150nmol)を0.95mlの0.1Mリン酸緩衝液、pH6.5に溶解させ、GMBS0.42mg(1.5 $\mu$ mol)を含むDMF溶液50 $\mu$ lと混合し、室温で30分間反応させたのち、セファデックスG-25カラムで分画した。このようにして作製した、マレイミド基の導入されたHRP4.2mg(105nmol)と実施例1(実験例7)で作製された[Cys<sup>17</sup>]19P2リガンド(17-31

20

25

) 0.55mg (315nmol) とを混合し、4℃で1日反応させた。反応後ウルトロゲル AcA 44 (LKB-ファルマシア社製) カラムで分画し、HRP 標識化 19P2 リガンド (17-31) を得た。

(2) HRP 標識化 19P2 リガンド (12-25) の作製

- 5 上記実施例 1 (実験例 12) で得られた [Cys<sup>25</sup>] 19P2 リガンド (12-25) と HRP とを架橋し、EIA の標識体とした。即ち、HRP 6mg (150nmol) を 1.4ml の 0.1M リン酸緩衝液、pH 6.5 に溶解させ、GMBS 0.42mg (1.5μmol) を含む DMF 溶液 100μl と混合し、室温で 30 分間反応させたのち、セファデックス G-25 カラムで分画した。このようにして作製した、マレイミド基の導入された HRP
- 10 4.2mg (105nmol) と実施例 1 (12) で作製された [Cys<sup>25</sup>] 19P2 リガンド (12-25) 0.48mg (315nmol) とを混合し、4℃で1日反応させた。反応後ウルトロゲル AcA 44 カラムで分画し、HRP 標識化 19P2 リガンド (12-25) を得た。

15 [実施例 5] 抗体価の測定

(1) [Cys<sup>17</sup>] 19P2 リガンド (17-31) - BTG を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

- [Cys<sup>17</sup>] 19P2 リガンド (17-31) - BTG を免疫中のマウス抗血清中の抗体価を同様の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートを作製するため、まず抗マウスイムノグロブリン抗体 (IgG 画分、カッペル社製) を 100μg/ml 含む 0.1M 炭酸緩衝液、pH 9.6 溶液を 96 ウェルマイクロプレートに 100μl ずつ分注し、4℃で 24 時間放置した。次に、プレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.4) で洗浄したのち、ウェルの余剰の結合部位をふさぐため 2.5% ブロックエース (雪印乳業社製) を含む PBS を 300μl ずつ分注し、4℃で少なくとも 24 時間処理し
- 25 た。

上記、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファー C [



1% BSA、0.4M NaCl、および2mM EDTAを含む0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0] 50  $\mu$ l、バッファーCで希釈したマウス抗[Cys<sup>17</sup>]19P2リガンド(17-31)-BTG 抗血清100  $\mu$ lを加え4℃で16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、上記実施例4(1)で作製したHRP標識化19P2リガンド(17-31) (バッファーCで300倍希釈) 100  $\mu$ lを加え室温で1日反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム (KIRKEGAARD&PERRY LAB, INC、フナコシ薬品取り扱い) 100  $\mu$ lを加え室温で10分間反応させることにより測定した。反応を1Mリン酸100  $\mu$ lを加え停止させたのち、450 nmの吸収をプレートリーダー (BIOCHROMATIC、大日本製薬社製) で測定した。結果を〔図1〕に示す。免疫した8匹のマウス全てに19P2リガンド(17-31)に対する抗体価の上昇が認められた。

(2) [Cys<sup>25</sup>]19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

[Cys<sup>25</sup>]19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫中のマウス抗血清中の抗体価を同様の方法により測定した。バッファーCで希釈したマウス抗[Cys<sup>25</sup>]19P2リガンド(12-25)-BTG抗血清100  $\mu$ lを加え4℃で16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、上記実施例4(2)で作製したHRP標識化19P2リガンド(12-25) (バッファーCで500倍希釈) 100  $\mu$ lを加え室温で1日反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム (KIRKEGAARD&PERRY LAB, INC、フナコシ薬品取り扱い) 100  $\mu$ lを加え室温で10分間反応させることにより測定した。反応を1Mリン酸100  $\mu$ lを加え停止させたのち、450 nmの吸収をプレートリーダー (BIOCHROMATIC、大日本製薬社製) で測定した。結果を〔図2〕に示す。免疫した8匹のマウス全てに19P2リガンド(12-25)に対する抗体価の上昇が認められた。結果を〔図2〕に示す。免疫した8匹のマウスのうち3匹に比較的高い抗体価が認められた。

## 〔実施例6〕モノクローナル抗19P2リガンド抗体の作製

比較的高い抗体価を示したマウスに対して200～300 $\mu$ gの免疫原を生理食塩水0.

25～0.3mlに溶解させたものを静脈内に接種することにより最終免疫を行なった。最終免疫3～4日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫、ろ過し、イーグ

5 ルズ・ミニマム・エッセンシャルメデイウム (MEM) に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液を得た。

細胞融合に用いる細胞として、BALB/Cマウス由来ミエローマ細胞P3-X63.Ag

8.U1 (P3U1) を用いた〔カレント トピックス イン マイクロバイオロジー アンド

イムノロジー、81、1 (1978)〕。細胞融合は、原法〔ネイチャー、256、495 (1975)〕 に準

10 じて行なった。即ち、脾臓細胞およびP3U1をそれぞれ血清を含有しないMEMで3度洗

浄し、脾臓細胞とP3U1数の比率を10:1になるよう混合して、800回転で15分間

遠心を行なって細胞を沈殿させた。上清を充分に除去した後、沈殿を軽くほぐし、45%ポ

リエチレングリコール (PEG) 6000 (コッホライト社製) を0.3ml加え、37℃

温水槽中で7分間静置して融合を行なった。融合後細胞に毎分2mlの割合でMEMを添加

し、合計15mlのMEMを加えた後600回転15分間遠心して上清を除去した。この細

15 胞沈殿物を10%牛胎児血清を含有するGITメデイウム (和光純薬) (GIT-10% FCS) にP3U1が1ml当り $2 \times 10^5$ 個になるように浮遊し、24穴マルチディッシュ

(リンプロ社製) に1ウェル1mlずつ192ウェルに播種した。播種後、細胞を37℃で

5%炭酸ガスインキュベーター中で培養した。24時間後HAT (ヒポキサンチン $1 \times 10^{-4}$ M、

20 10% FCS培地 (HAT培地) を1ウェル当り1mlずつ添加することにより、HAT選

択培養を開始した。HAT選択培養は、培養開始3、6、9日後に旧液を1ml捨てたあと、1mlのHAT培地を添加することにより継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合

後9～14日で認められ、培養液が黄変したとき (約 $1 \times 10^6$ セル/ml)、上清を採取し、実施例5に記載の方法に従って抗体価を測定した。

[Cys<sup>17</sup>]19P2リガンド (17-31) -BTGを免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo. 6 (図1参照) を用いて得られた結果を

〔図3〕に示した。これらも含め計2種類のハイブリドーマを選択した〔表1〕。

表1

抗ヒト19P2リガンド(18-31)モノクローナル抗体の反応性

5 10	反 応 性 1)					備考
	ハイブリドーマ株 No.	h(1-31)n	h(1-31)-OH	b(1-31)n	クラス/サブクラス	
	1	+	—	+	IgG1, $\kappa$	P2L-1C
	2	+	+	±		
	3	+	—	+		
	4	+	+	±	IgG1, $\kappa$	P2L-2C
	5	±	—	±		
	6	+	+	±	IgG1, $\kappa$	
	7	+	—	+	IgG1, $\kappa$	
	8	+	—	+	IgGM, $\kappa$	

1) h(1-31)nはヒト19P2-L31、h(1-31)-OHはヒト19P2リガンド(1-31)-OHおよびb(1-31)nはウシ19P2-L31を表す。

2) 100 nMの抗原〔ヒト19P2-L31、ヒト19P2リガンド(1-31)-OH、ウシ19P2-L31〕が存在した時  
 + :  $(B/B_0) < 0.50$   
 ± :  $0.50 \leq (B/B_0) < 0.80$   
 — :  $0.80 \leq (B/B_0)$

ただし、B : 抗原存在時の抗体に結合したHRP標識化ヒト19P2リガンド(18-31)量

B<sub>0</sub> : 抗原非存在時の抗体に結合したHRP標識化ヒト19P2リガンド(18-31)量

〔Cys<sup>25</sup>〕19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo. 1 (図2参照)を用いて得られた結果を〔図4〕に示した。これらも含め計3種類のハイブリドーマを選択した〔表2〕。

表2

抗ヒト19P2リガンド(12-24)モノクローナル抗体の反応性

反 応 性 1)					
5	ハイブリドーマ株 No.	h(1-31)n	h(12-31)n	r(1-31)n	クラス/サブクラス 備考
	1	+	+	+	IgG2b, $\kappa$ P2L-1T
	2	+	+	+	IgG1, $\kappa$ P2L-3T
	3	+	+	±	IgG1, $\kappa$ P2L-2T
	4	±	±	±	
	5	+	+	±	
	6	+	+	+	IgGM, $\kappa$ P2L-4T
	7	-	-	±	
10	8	±	±	±	
	9	-	-	±	
	10	±	+	±	
	11	+	+	±	
	12	-	-	±	

1) h(1-31)nはヒト19P2-L31、h(12-31)nはヒト19P2-L20およびr(1-31)nはラット19P2-L31を表す。

2) 10 nMの抗原[ヒト19P2-L31、ヒト19P2-L20、ラット19P2-L31]が存在した時

- 15
- +
- ±
- 
- : (B/B<sub>0</sub>) < 0.50
- : 0.50 ≤ (B/B<sub>0</sub>) < 0.75
- : 0.75 ≤ (B/B<sub>0</sub>)

ただし、B : 抗原存在時の抗体に結合したHRP標識化ヒト19P2リガンド(12-24)量

B<sub>0</sub> : 抗原非存在時の抗体に結合したHRP標識化ヒト19P2リガンド(12-24)量

次に、これらのハイブリドーマを限界希釈法によるクローニングに付した。クローニング

20 に際しては、フィーダー細胞としてBALB/Cマウスの胸腺細胞をウェル当り  $5 \times 10^5$  個になるように加えた。クローニング後、ハイブリドーマを、あらかじめミネラルオイル0.5mlを腹腔内投与されたマウス(BALB/C)に  $1 \sim 3 \times 10^6$  セル/匹を腹腔内投与したのち、6~20日後に抗体含有腹水を採取した。

モノクローナル抗体は得られた腹水よりプロテイン-Aカラムにより精製した。即ち、

25 腹水6~20mlを等量の結合緩衝液(3.5M NaCl、0.05%NaN<sub>3</sub>を含む1.5Mグリシン、pH9.0)で希釈したのち、あらかじめ結合緩衝液で平衡化したリコン

ピナントプロテイン-A-アガロース (Repligen 社製) カラムに供し、特異抗体を溶離緩衝液 (0.05%  $\text{NaN}_3$  を含む 0.1 M クエン酸緩衝液、pH 3.0) で溶出した。溶出液は PBS に対して 4℃、2 日間透析したのち、0.22  $\mu\text{m}$  のフィルター (ミリポア社製) により除菌濾過し 4℃あるいは -80℃で保存した。モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定に際しては、精製モノクローナル抗体結合固相を用いるエンザイム-リンクドイムノソーベントアッセイ (ELISA) 法を行った。即ち、抗体 2  $\mu\text{g/ml}$  を含む 0.1 M 炭酸緩衝液、pH 9.6 溶液を 96 ウェルマイクロプレートに 100  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、4℃で 24 時間放置した。上記実施例 5 で述べた方法に従って、ウェルの余剰の結合部位をブロックエースでふさいだのち、アイソタイプタイピングキット (Mouse-Typer<sup>TM</sup> Sub-Isotyping Kit バイオラッド社製) を用いる ELISA によって固相化抗体のクラス、サブクラスを調べた。

#### 〔実施例 7〕 競合法酵素免疫測定法

##### (1) 競合法-EIA (その 1)

[Cys<sup>17</sup>]19P2 リガンド (17-31) -BTG を免疫原として作製したモノクローナル抗体の反応特異性を以下の方法により調べた。まず、各モノクローナル抗体溶液の抗体価を実施例 5 (1) 記載の方法により調べ、競合法-EIA に用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約 50% となる抗体濃度 (約 30~50 ng/ml) を決定した。次に、上記実施例 5 記載の抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、決定された濃度にバッファー C で希釈された抗体溶液 50  $\mu\text{l}$ 、ヒト、ラットおよびウシ 19P2 リガンド (1-31) あるいは 19P2 リガンド部分ペプチド、即ちヒト 19P2 リガンド (1-30)、ヒト [D-Ala<sup>29</sup>] -19P2 リガンド (1-31)、ヒト 19P2 リガンド (20-31)、ウシ 19P2 リガンド (1-31)-OH、ウシ 19P2 リガンド (1-31)-Gly-Arg-OH のバッファー C 溶液 50  $\mu\text{l}$ 、および上記実施例 4 (1) 記載 HRP 標識化 19P2 リガンド (17-31) (バッファー C で 400 倍希釈) を 50  $\mu\text{l}$  加え、4℃で 16 時間反応させた。反応後、PBS で洗浄したのち固相上の酵素活性を上記実施例 5 (1

記載の方法により測定した。結果を〔表1〕に示す。いずれの抗体もHRP標識化19P2リガンド(17-31)と反応し、またヒト19P2リガンド(1-31)に対しても反応性を有していた〔表1〕。当初選択したモノクローナル抗体4種類のうちのうち2種類がウシおよびラット19P2リガンド(1-31)とも同程度に反応した。典型例として、

- 5 これらの中でヒト、ラットおよびウシ19P2リガンド(1-31)に対して最も高い反応性を示したモノクローナル抗体P2L-1Ca(IgG1,  $\kappa$ )の競合法-EIAの結果を〔図5(a)〕に示す。これらの抗体がヒト、ラットおよびウシ19P2リガンド(1-31)に対して同程度の反応性を有することが分かる。P2L-1Cのヒト19P2リガンド(1-31)の標準曲線から、 $(B/B_0) = 0.5$ を与える19P2リガンド(1-31)濃度は、3 nM、1.1 ng/wellであることが分かった。また、この抗体はP2L-1Cは、ヒト[D-Ala<sup>29</sup>]-19P2リガンド(1-31)との反応性は弱いながらも示すものの、ヒト19P2リガンド(1-30)、ウシ19P2リガンド(1-31)-OHおよびウシ19P2リガンド(1-31)Gly-Arg-OHに対しては交差反応性を示さないことから、19P2リガンド(1-31)のC端部分の部分構造を認識し、31残基目のPheと
- 10 C末端のアミドを認識することが分かった〔図6(a)〕。一方、P2L-2Cを用いた場合の競合法-EIAの結果を〔図5(b)〕に示した。P2L-2C(IgG1,  $\kappa$ )のヒト19P2リガンド(1-31)に対する反応性( $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 1.5 nM、0.5 ng/well)は、ウシ19P2リガンド(1-31)に対する反応性( $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 50 nM、18 ng/well)の33倍、ラット
- 15 19P2リガンド(1-31)に対する反応性( $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 200 nM、73 ng/well)の130倍であることが分かった。これらの結果から、P2L-2Cは、ヒト、ウシ、ラットで配列の異なる19P2リガンド(1-31)の21残基のAlaおよび22残基のSerを強く認識しているものと考えられる。

25 (2) 競合法-EIA(その2)

抗[Cys<sup>25</sup>]19P2リガンド(12-25)-BTGモノクローナル抗体の反応特異性を

同様の方法により調べた。まず、各モノクローナル抗体溶液の抗体価を実施例5（2）記載の方法により調べ、競合法-EIAに用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約50%となる抗体濃度（約30~50 ng/ml）を決定した。次に、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、決定された濃度にバッファーCで希釈された抗体溶液50  $\mu$ l、ヒトおよびラット19P2リガンド（1-31）あるいは19P2リガンド部分ペプチド、即ちヒト19P2リガンド（12-31）、ヒト19P2リガンド（17-31）およびヒト19P2リガンド（17-31）のジアセチル体のバッファーC溶液50  $\mu$ l、および上記実施例4（2）記載HRP標識化19P2リガンド（12-25）（バッファーCで500倍希釈）を50  $\mu$ l加え、4℃で16時間反応させた。反応後、PBSで洗浄したのち固相上の酵素活性を上記実施例5（1）記載の方法により測定した。結果を〔表2〕に示す。いずれの抗体もHRP標識化19P2リガンド（12-31）と反応し、またヒト19P2リガンド（1-31）およびラット19P2リガンド（1-31）に対しても反応性を有していた。典型例として、これらの中でヒトあるいはラット19P2リガンド（1-31）に対して最も高い反応性を示したモノクローナル抗体として、P2L-1Ta（IgG<sub>2b</sub>,  $\kappa$ ）あるいはP2L-3Ta（IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$ ）の競合法-EIAの結果を〔図7〕に示す。P2L-1Taのヒト19P2リガンド（1-31）の標準曲線から、（B/B<sub>0</sub>）=0.5を与えるヒト19P2リガンド（1-31）濃度は、4 nM、1.6 ng/wellであることが分かった。さらに、P2L-1Taの19P2リガンド（12-31）に対する反応性（（B/B<sub>0</sub>）=0.5を与える抗原濃度：4 nM、0.88 ng/well）はヒト19P2リガンド（1-31）と同程度、ラット19P2リガンド（1-31）に対する反応性（（B/B<sub>0</sub>）=0.5を与える抗原濃度：1 nM、0.4 ng/well）は、4倍であることが分かった〔図7（a）〕。一方、P2L-3Taの19P2リガンドに対する反応性は、（B/B<sub>0</sub>）=0.5を与えるヒト19P2リガンド（1-31）濃度は、4 nM、1.6 ng/wellであることが分かった。さらに、P2L-1Taの19P2リガンド（12-31）に対する反応性（（B/B<sub>0</sub>）=0.5を与える抗原濃度：7 nM、1.54 ng/well）はヒト19P2リガンド（1-31）の1/2、ラット19P2

リガンド (1-31) に対する反応性 ( $B/B_0 = 0.5$  を与える抗原濃度: 25 nM, 0.4 ng/well) は、6 倍であることが分かった [図 7 (b)]。また、いずれの抗体はともに、ヒト 19P2 リガンド (17-31) および 2Ac-ヒト 19P2 リガンド (17-31) に対しては交差反応性を示さないことから、19P2 リガンド (12-16) の部分構造を認識することが分かった [図 8]。また、[図 9] に、これら 2 種類の抗体に加え、当初選択したヒト 19P2 リガンド (1-31) に対して高い反応性を示したモノクローナル抗体 2 種類、P2L-2Ta および P2L-4Ta を用いた競合法-EIA におけるヒト 19P2 リガンド (1-31) の標準曲線を示した。これら抗体の ( $B/B_0 = 0.5$  を与えるヒト 19P2 リガンド (1-31) の濃度は、3~50 nM の範囲にあり、その中で P2L-1Ta を用いる競合法-EIA が最も高感度であり、約 0.1 nM [ $(B/B_0 = 0.9)$ ] のヒト 19P2 リガンド (1-31) が検出可能であった。

#### [実施例 8] HRP 標識化抗 19P2 リガンドモノクローナル抗体の作製

##### (1) P2L-1Ta-HRP

P2L-1Ta 精製画分 18mg (120 nmol) を含む 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6.8 溶液に GMB S 1.43  $\mu$ mol を含む DMF 50  $\mu$ l を加え、室温で 40 分反応させた。反応液をセファデックス G-25 カラム (溶離液、0.1 M リン酸緩衝液、pH 6.7) で分離し、マレイミド基の導入された抗体画分 13mg を得た。次に、HRP 15.5 mg (387 nmol) を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (0.15 M NaCl も含む)、pH 6.8、1.4 ml に N-スクシニミジル-3-(2-ピリミジルジチオ) プロピオネート (SPDP) 5.8  $\mu$ mol を含む DMF 60  $\mu$ l を加え、室温で 40 分反応させた。次に、68  $\mu$ mol のジチオスレイトールを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.4 ml を加え、室温で 20 分反応させた後セファデックス G-25 カラム (溶離液、2 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6.0) で分離し、SH 基の導入された HRP 11 mg を得た。次に、SH 基の導入された HRP 8mg とマレイミド基の導入された抗体画分 3 mg とを混合し、コロジオンバッグ (ザルトリウス社製) で約 0.5 ml にまで濃縮したの



ち、4℃で16時間放置した。反応液を溶離液に0.1Mリン酸緩衝液、pH6.5を用いるSephacryl S-300HRカラム（Pharmacia社製）に供し、P2L-1Ta-HRP複合体画分を精製した。

(2) P2L-3Ta-HRP

- 5 同様の方法により、P2L-3Ta精製画分15mgとHRP16mgを用いてP2L-3T-HRP複合体を作製した。

〔実施例9〕 サンドイッチ法-EIA

(1) P2L-1Ta-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性と感度

- 10 上記実施例6記載の精製したモノクローナル抗体P2L-1Caを10 $\mu$ g/ml含む0.1M炭酸緩衝液、pH9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに100 $\mu$ lずつ分注し、4℃で24時間放置した。ウェルの余剰の結合部位をPBSで4倍希釈したブロックエース400 $\mu$ lを加え不活化した。

- 15 以上のように調製したプレートに、バッファーEC〔10%ブロックエース、0.2%BSA、0.4M NaCl、0.05% CHAPS〔3-[(コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸〕を含む0.02Mリン酸緩衝液、pH7〕で希釈した19P2リガンド(1-31)標準液100 $\mu$ lを加え、4℃で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例8で作製したP2L-1Ta-HRP(バッファーCで20,000倍希釈)100 $\mu$ lを加え、4℃で24時間反応させたが、標識体濃度としては30,000倍希釈のものを用了。PBSで洗浄したのち、上記実施例5記載の方法によりTMBを用いて固相上の酵素活性を測定した(酵素反応20分)。結果を〔図10〕に示すように、極めて高感度に19P2リガンド(1-31)を検出することがわかった。即ち、このサンドイッチ法-EIAは、ヒト19P2リガンド(1-31)および19P2リガンド(12-31)を0.1 fmol/wellで、ウシ19P2リガンド(1-31)および19P2リガンド(12-31)を0.1 fmol/wellで、ラット19P2リガンド(1-31)を0.03 fmol/wellで検出することが可能であり、他の視床下部ペプチドTRH、LHRH、
- 20
- 25

GHRH、CRF、SSTおよびOxytocinは全く検出しなかった〔図11〕。したがって、固相抗体としてP2L-1Cを用い、標識体としてP2L-1Ta-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAは、種にかかわらず19P2リガンド(1-31)および19P2リガンド(12-31)を極めて高感度にかつ極めて選択的に検出することが可能であるとわかった。

(2) P2L-3Ta-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性と感度

固相抗体としてP2L-1Caを用い、標識体として上記実施例8(2)で作製したP2L-3Ta-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性および感度を調べた。上記実施例9(1)と同様にヒト19P2リガンド(1-31)、19P2リガンド(12-31)およびラット19P2リガンド(1-31)に対する反応性を調べたが、標識体濃度としては、1,000倍希釈のものを用いた〔図12〕。その結果、P2L-3Ta-HRPを用いたサンドイッチ法-EIAは、ヒト19P2リガンド(1-31)を0.3 fmol/wellで、19P2リガンド(12-31)を1 fmol/wellで、ラット19P2リガンド(1-31)を3 fmol/wellで検出可能であったが、P2L-1Ta-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAと比較して、3-10倍感度が低いものであった。

〔実施例10〕 P2L-1Caによる19P2リガンド(1-31)の生物活性の中和作用

P2L-1Caによる19P2リガンド(1-31)に対する中和活性を19P2レセプター発現CHO細胞を用いたアラキドン酸代謝物放出活性測定系により測定した。即ち、P2L-1Ca、P2L-3Caおよびコントロール抗体としてP2L-1Caと同じIgGサブクラス構造(IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$ )である抗エンドセリンモノクローナル抗体(AwETN40)を各濃度に希釈し、ラット19P2リガンド(1-31) ( $5 \times 10^{-10}$  M)と室温で1時間インキュベーション後、残存活性を19P2レセプター発現CHO細胞を使用して測定した。アラキドン酸代謝物放出活性の測定は、19P2レセプター発現CHO細胞を、24 well plateに  $0.5 \times 10^5$  cells/well でまき、24時間培養後、 $[^3\text{H}]$  アラキドン酸を0.5

$\mu\text{Ci}/\text{well}$  となるように添加した。 [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸添加24時間後、細胞を0.1% BSAを含むMEMで洗浄後、上述の各モノクローナル抗体とラット19P2リガンド(1-31) 混和溶液を500  $\mu\text{l}/\text{well}$  で添加した。37℃で1時間インキュベーションした後、反応液500  $\mu\text{l}$  中400  $\mu\text{l}$  をシンチレーター4mlに加え、反応液中に遊離された [ $^3\text{H}$ ] アラキドン酸代謝物の量をシンチレーション・カウンターによりモニターした (図 13)。その結果、P2L-1Caは、19P2リガンド(1-31)の活性を  $5 \times 10^{-10}\text{M}$  で75%、  $5 \times 10^{-9}\text{M}$  で100%抑制した (図 13a)。一方、P2L-2Caは、19P2リガンド(1-31)の活性を  $5 \times 10^{-8}\text{M}$  で40%程度の抑制がみられたのみであった (図 13b)。以上のことから、P2L-1Caは、19P2リガンド(1-31)のアラキドン酸代謝物放出活性を中和することが明らかとなった。

#### [実施例11] 血漿中の19P2リガンド(1-31)の定量

ラット血漿(1ml)をSep-Pak Plus C18カートリッジ265mg (Waters社製)で濃縮・前処理した後、19P2リガンド(1-31)を上記実施例9記載サンドイッチ-EIAにより定量した。血漿の前処理方法は、まず4%酢酸含有86%エタノール4ml、メタノール4ml、蒸留水4ml、4%酢酸4mlを順次ながして活性化したSep-Pak Plus C18カートリッジに3mlの4%酢酸を添加し酸性化させた血漿1mlを負荷した。添加後、10mlの蒸留水で洗浄後、4%酢酸含有86%エタノール4ml、メタノール4mlで溶出し、37℃の窒素ガス気流下で濃縮した。濃縮画分を0.25mlのバッファーC中で再構成しサンドイッチ-EIAにより定量した。結果を[表3]に示した。ラット血漿中には  $0.2 \pm 0.03 \text{ fmol/ml}$  (mean  $\pm$  SEM, n=8)の19P2リガンド(1-31)が存在することが分かった。

表3

## ラット血漿中の19P2リガンドの定量

5	反 応 性 1)	
	ラットNo.	免疫反応性19P2リガンド (fmol/ml)
10	1	0.25
	2	0.11
	3	0.21
	4	0.21
	5	0.10
	6	0.05
	7	0.04
	8	0.19
15	9	0.21
	10	0.13
mean ± SD		0.15 ± 0.07

〔実施例12〕ラット血漿中の19P2リガンドの逆相高速液体クロマトグラフィー（RP  
20 -HPLC）による検出

上記実施例11記載ラット血漿中に含まれる19P2リガンド分子種を同定するため、ラ  
ット血漿50mlを上記実施例11記載の方法で部分精製し、この溶出画分を濃縮後ODS  
-80TMを用いる逆相HPLCによって分画した。

カラム条件

25 カラム：ODS-80TM（4.6 x 250 mm）

溶離液：A液（0.05%トリフルオロ酢酸含有 5%アセトニトリル）

B液（0.05%トリフルオロ酢酸含有 60%アセトニトリル）

溶出方法：溶離液Bの濃度を最初の5分間に0%から35%まで上昇させ、次に30分間かけて35-48%に直線的に上昇させた。

流速：1.0 ml/分

5 分画：0.5 ml/tube

溶出画分を減圧下、遠心濃縮乾固したのち、250mlのバッファーCに溶解させ、上記実施例10記載のサンドイッチEIAに供した。結果を図14に示す。血漿中の19P2リガンドの免疫活性はほとんど合成19P2リガンド（1-31）の溶出位置に検出されたことから、該サンドイッチ法-EIAが19P2リガンド（1-31）を検出していることが確認された。従って、本測定系は血漿中の19P2リガンドの変動を研究する際の重要な手段を提供すると思われる。

#### 産業上の利用可能性

本発明の19P2リガンドに対するモノクローナル抗体（特に、P2L-1Ca）は、極めて高い結合能を有し、かつ19P2リガンドのアラキドン酸代謝物放出活性を中和することが出来る。従って、19P2リガンドが有すると考えられる下垂体機能調節作用（例えば、プロラクチン分泌促進作用）、中枢神経調節作用、睪臓機能調節作用などに、異常がある場合の各種疾患の診断薬、予防薬、治療薬などに用いることができる。

本発明のモノクローナル抗体を用いるサンドイッチ法（特に、該モノクローナル抗体と19P2リガンドの中間部を認識する抗体とを用いるサンドイッチ法）による免疫学的測定法により、19P2リガンドまたはその誘導体を高感度かつ特異的に定量することができる。この定量方法は19P2リガンドまたはその誘導体の生理機能の解明に用いることができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体。
- 5 2. マウスIgGである請求項1記載のモノクローナル抗体。
3. P2L-1CaまたはP2L-2Caで標示される請求項2記載のモノクローナル抗体。
4. 19P2リガンドまたはその誘導体の中間部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体。
- 10 5. マウスIgGである請求項4記載のモノクローナル抗体。
6. P2L-1Taで標示される請求項5記載のモノクローナル抗体。
7. 請求項1または請求項4記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする被検液中の19P2リガンドまたはその誘導体の定量法。
8. 請求項1記載の抗体と請求項4記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする被
- 15 検液中の19P2リガンドまたはその誘導体の定量法。
9. 請求項1または請求項4記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

図 1

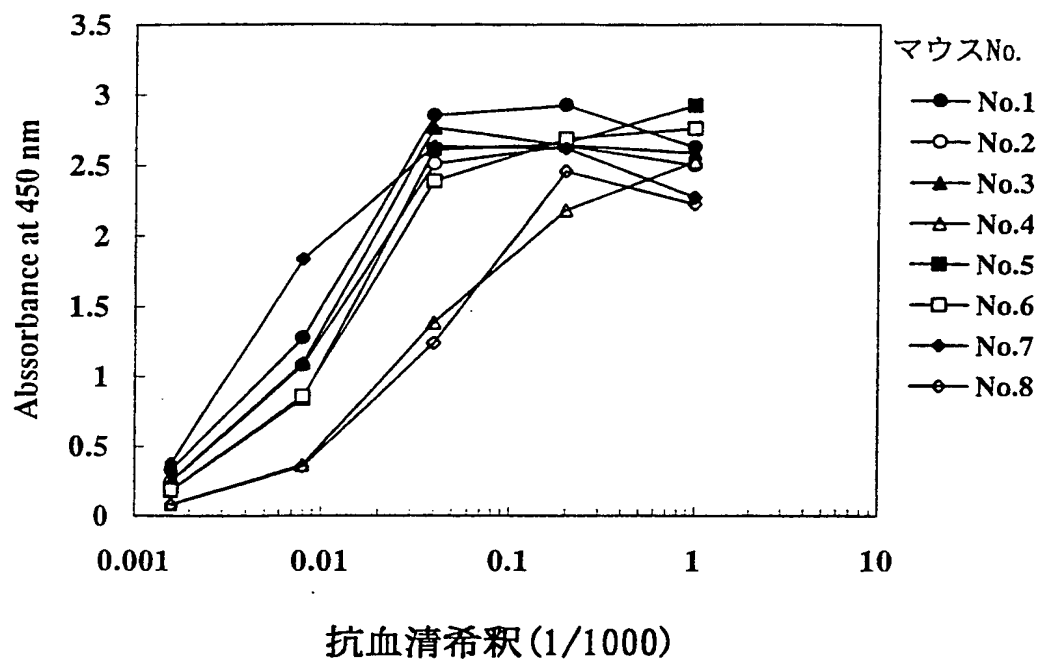
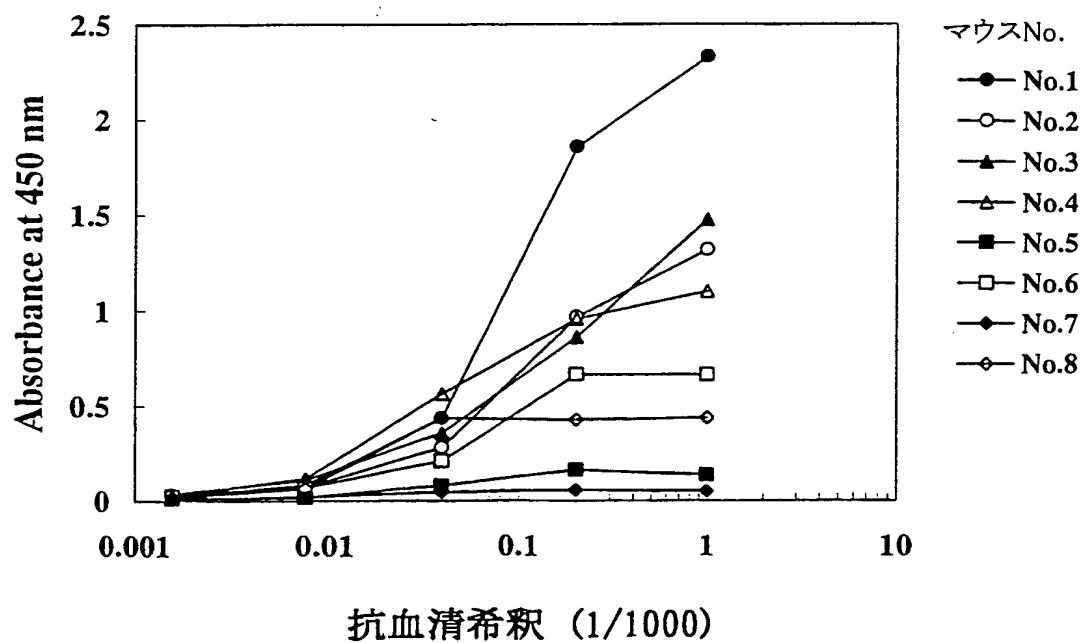


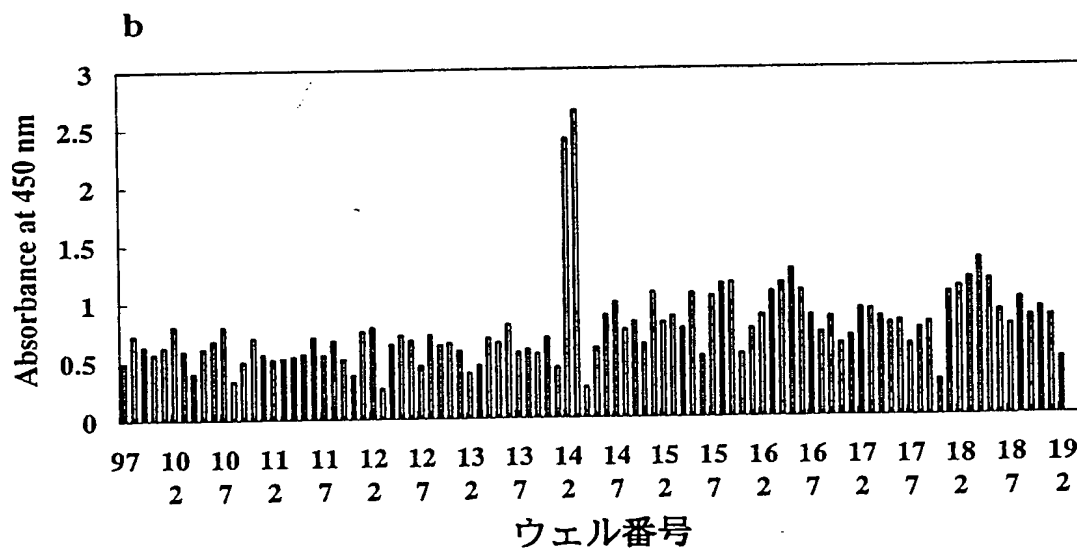
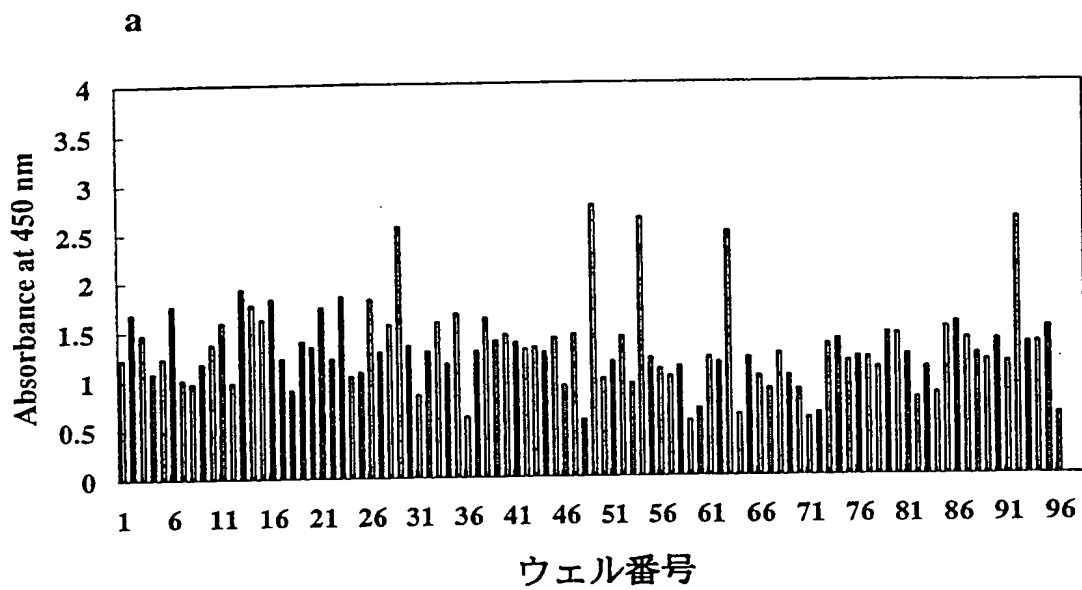
図 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



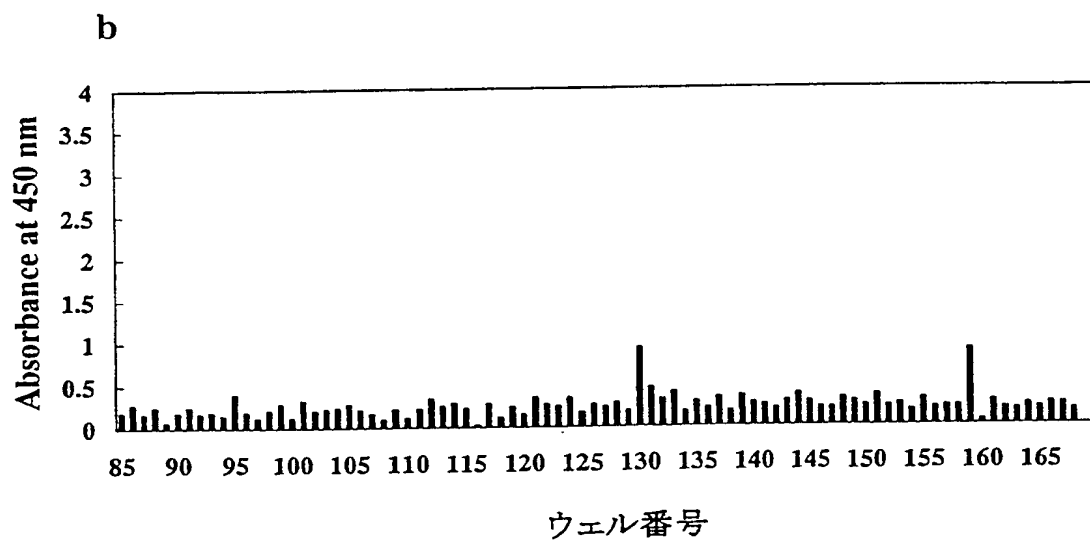
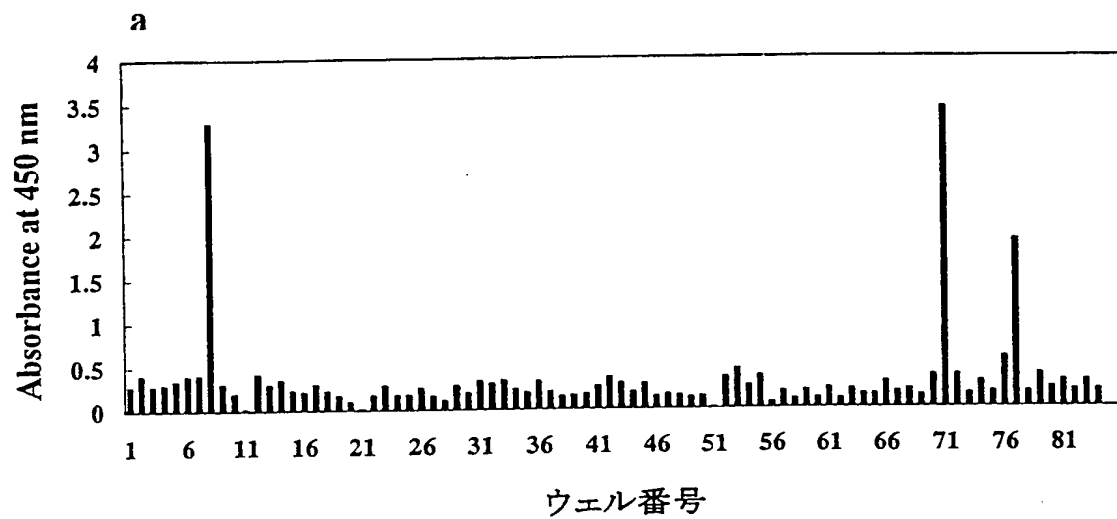
## 図 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

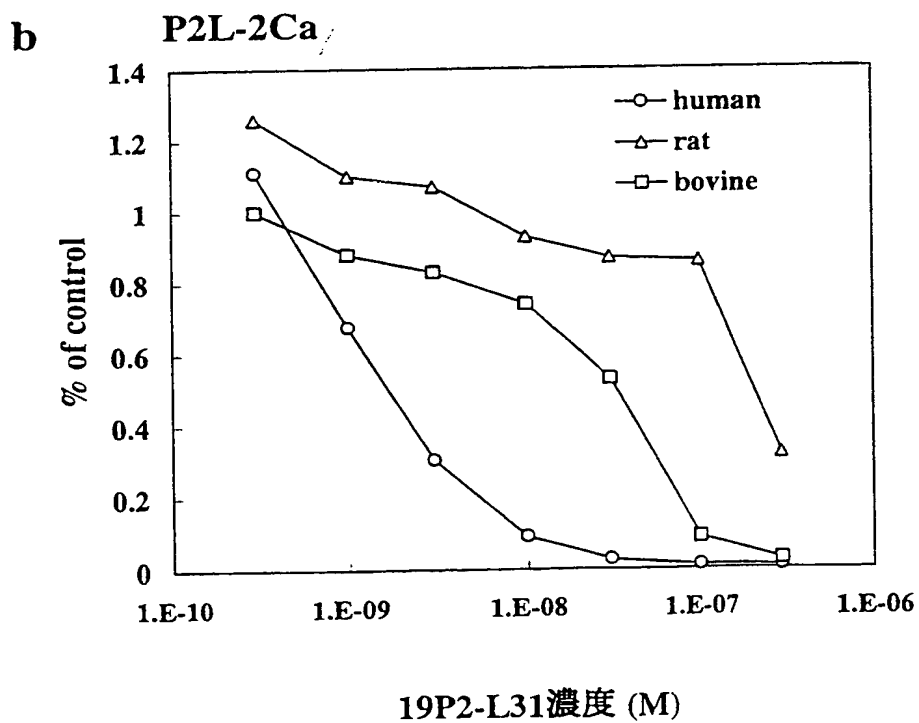
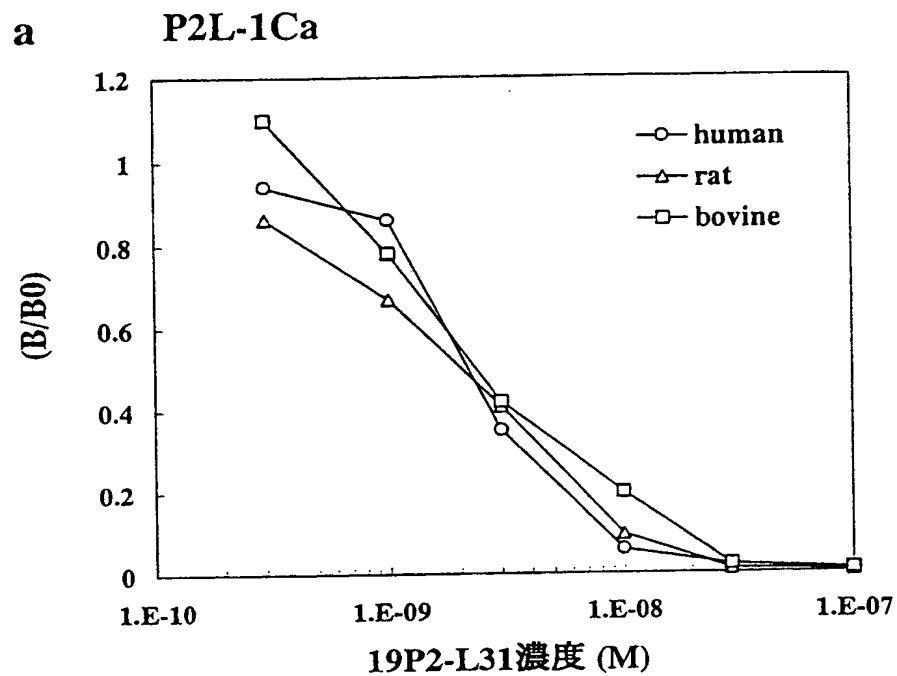


4



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

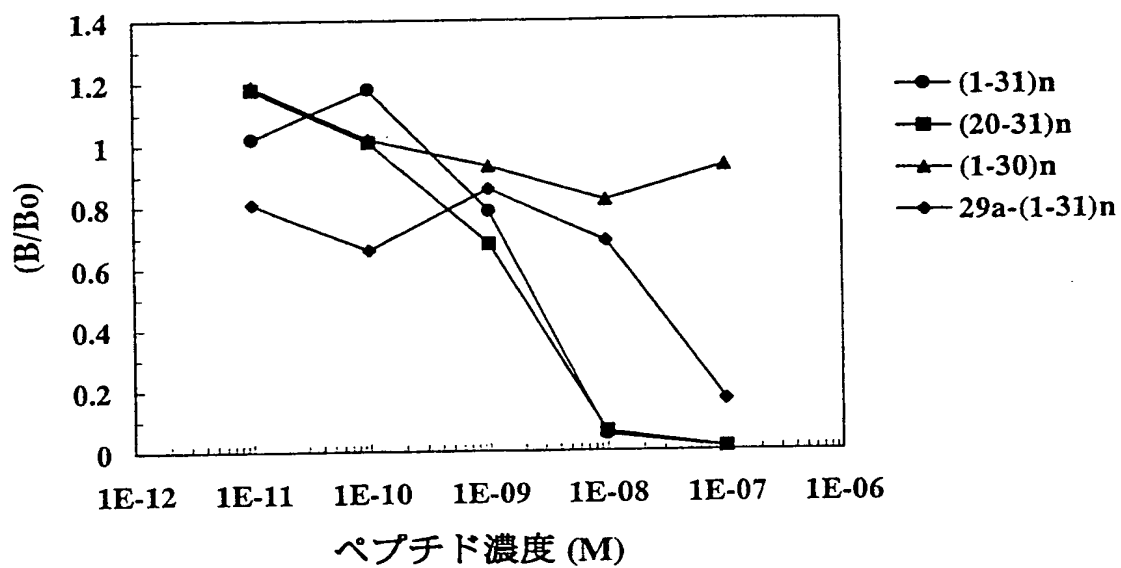
## 図 5



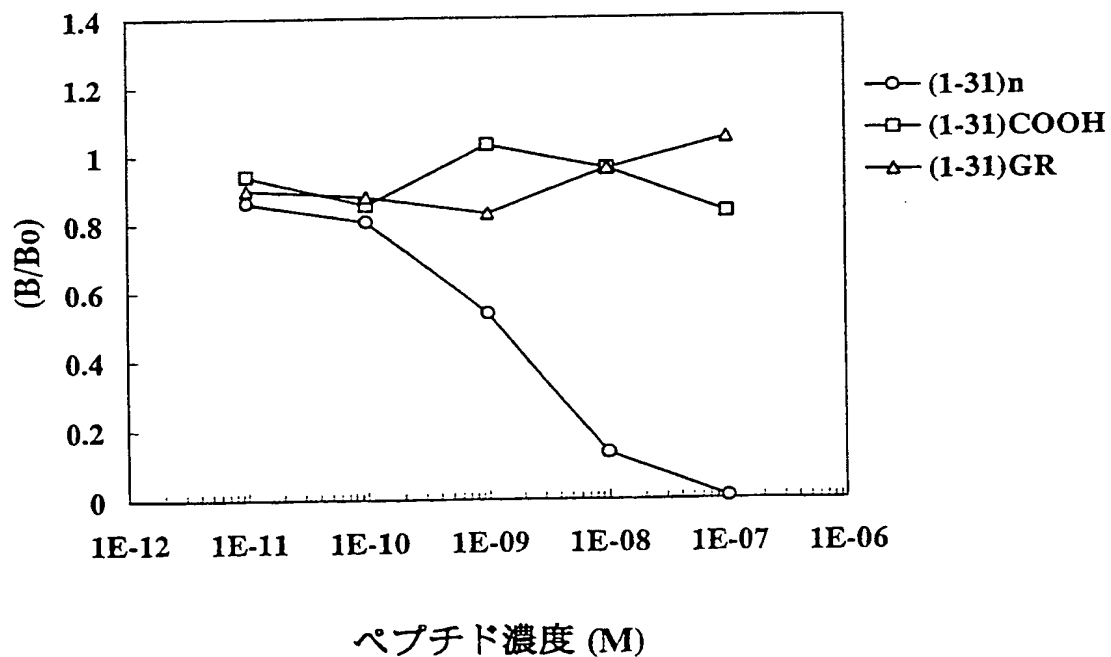
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 図 6

a ヒト19P2リガンド誘導体



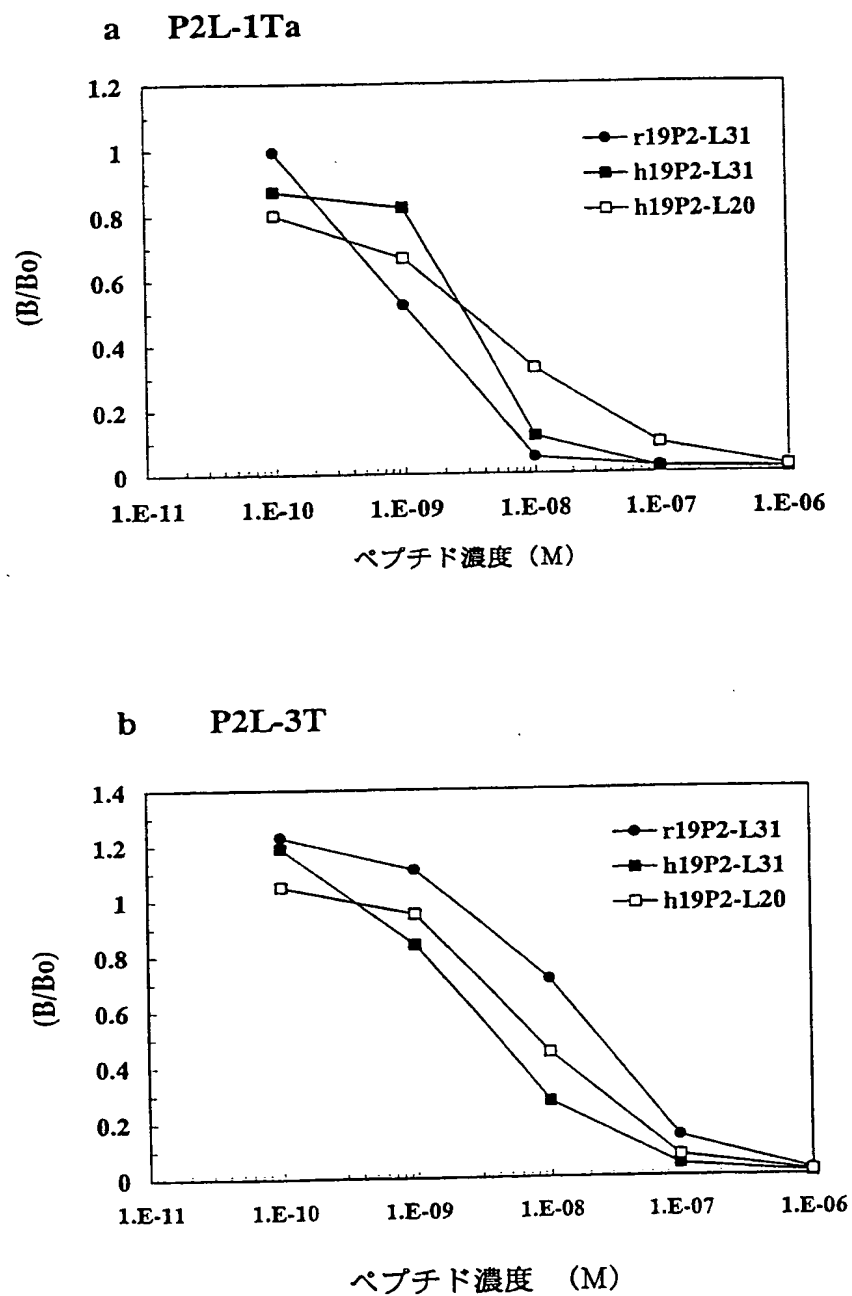
b ウシ19P2リガンド誘導体



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 図 7



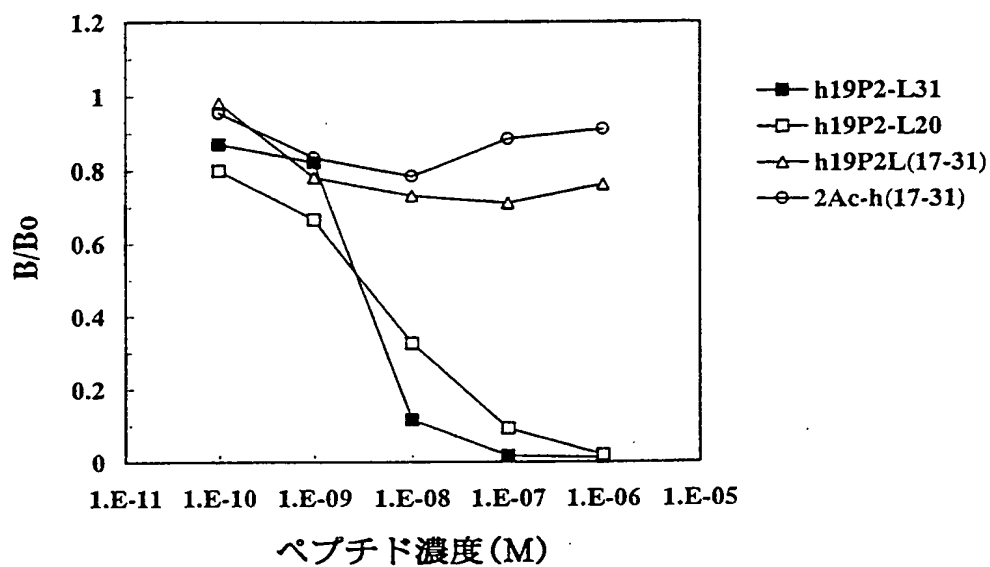
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/11

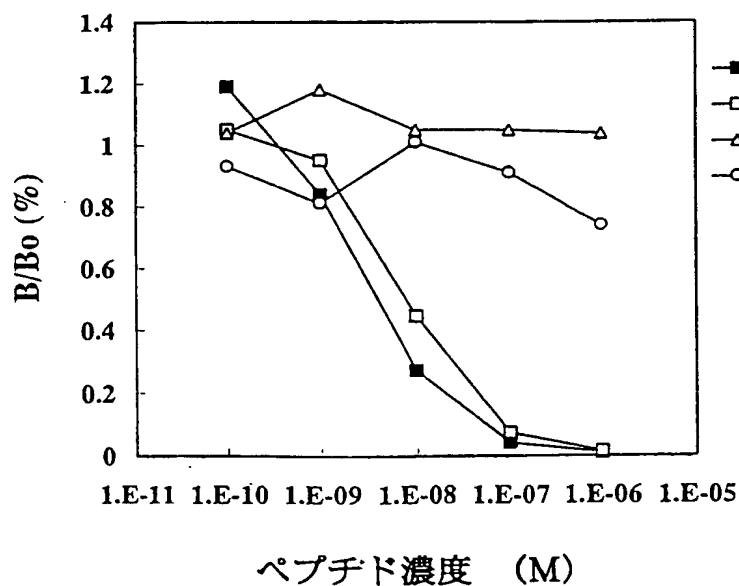
図

8

## a P2L-1Ta



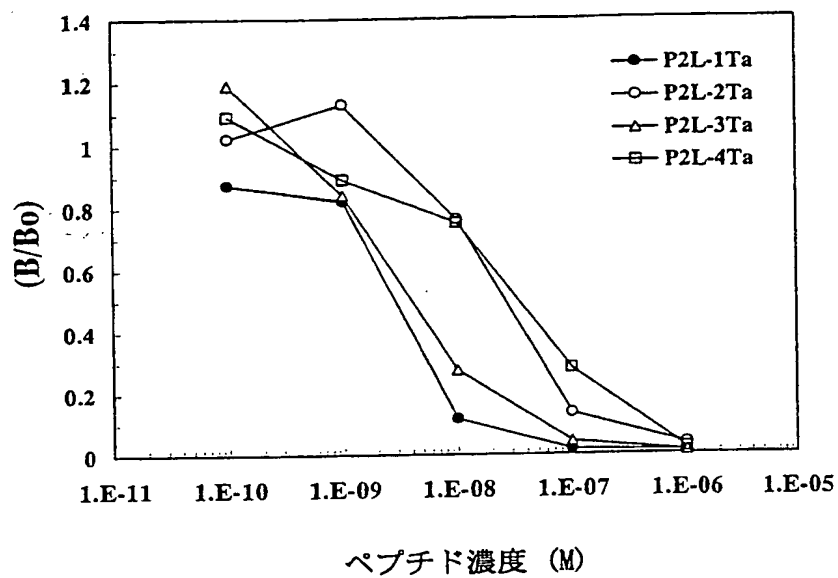
## b P2L-3Ta



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

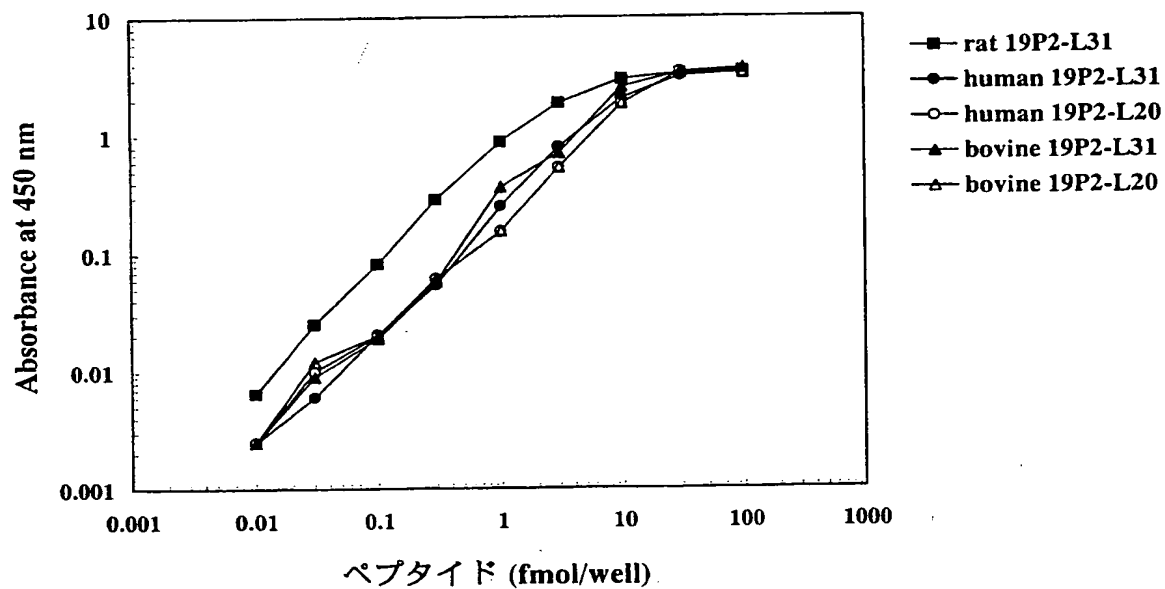
図

9



図

10



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 1 1

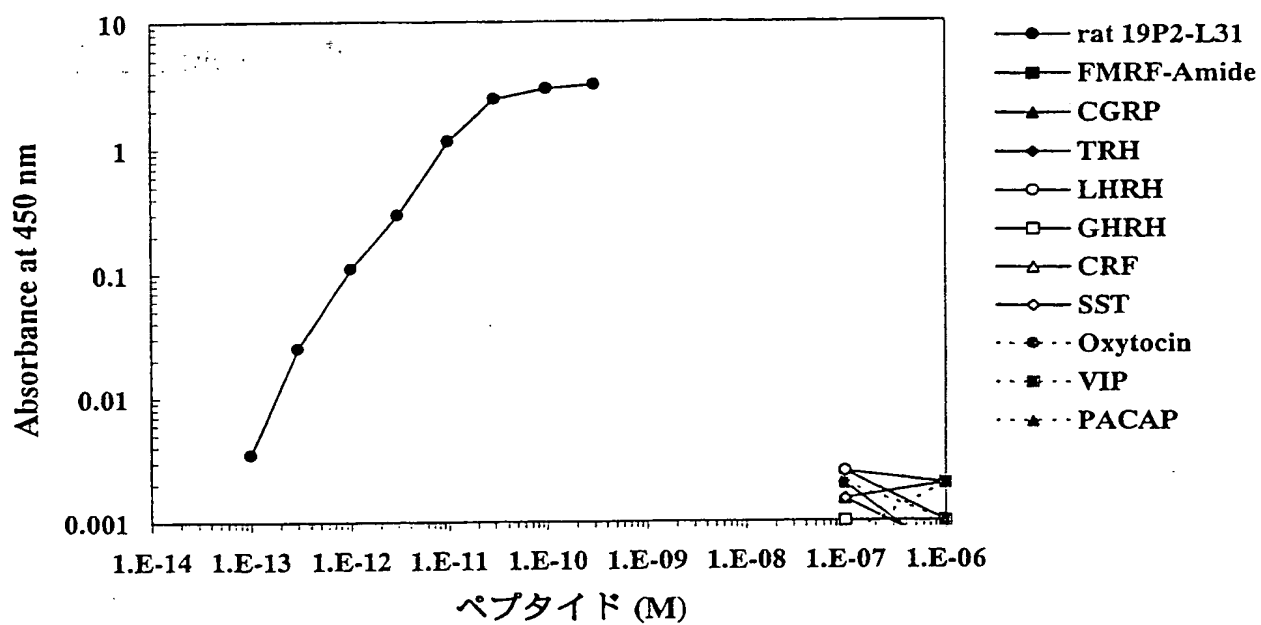
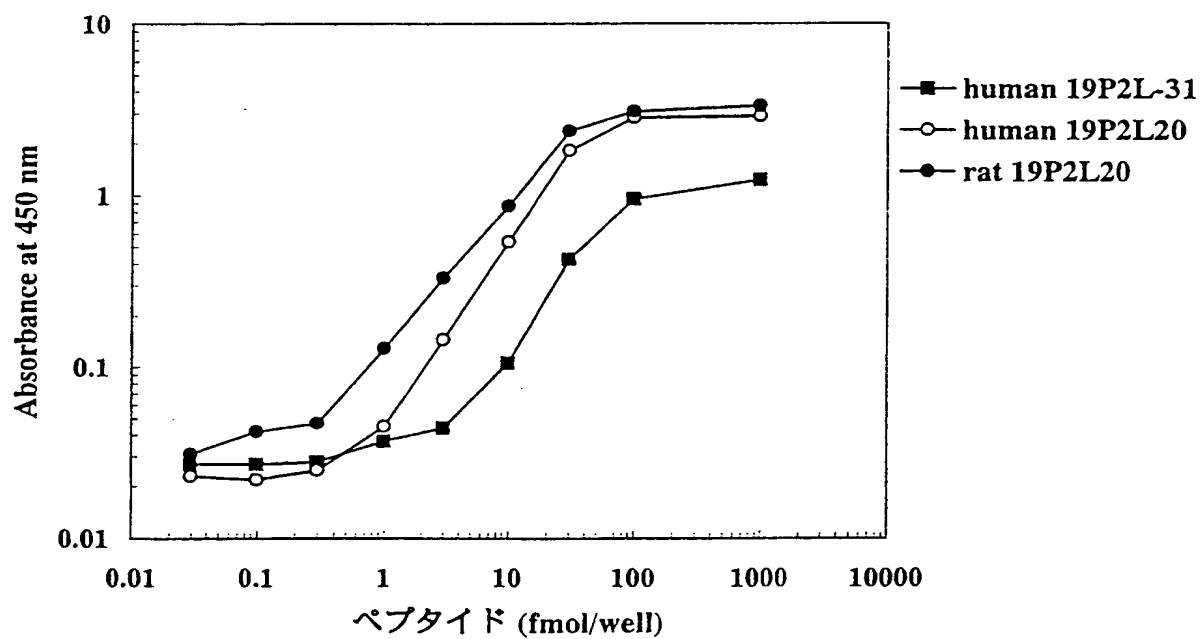


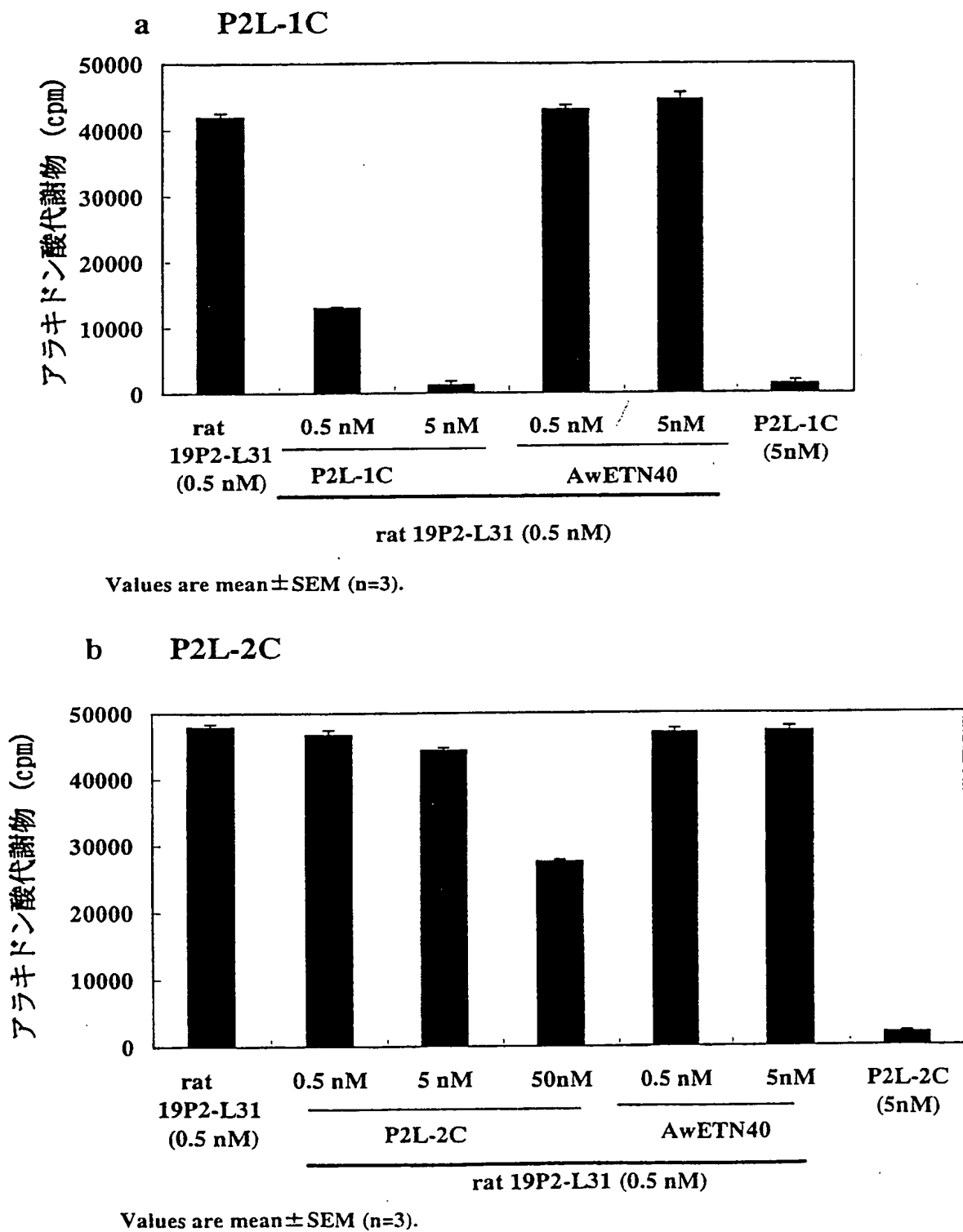
図 1 2



IS PAGE BLANK (USPTO)

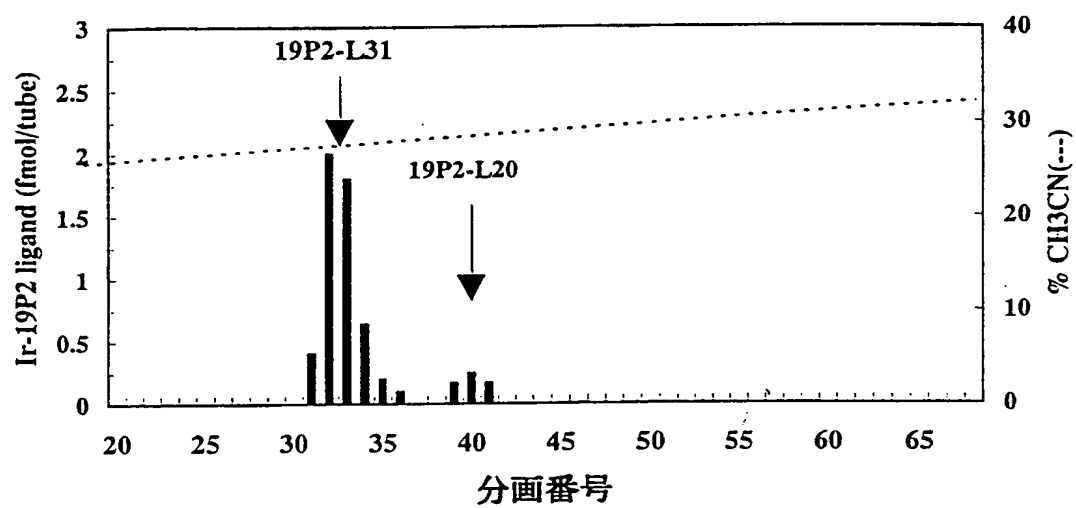


## 図 13



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 図 14



PAGE BLANK (USPTO)

## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Antibody and its use

<130> A98081

<150> JP 10-140293

<151> 1998-5-21

<160> 14

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Bovine

<223> Xaa means Phe-NH<sub>2</sub>

<400> 1

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Xaa

20

25

30

<210> 2

<211> 31

<212> PRT

<213> Human

<223> Xaa means Phe-NH<sub>2</sub>

<400> 2

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Xaa

20

25

30

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

<223> Xaa means Phe-NH<sub>2</sub>

&lt;400&gt; 3

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Xaa

20

25

30

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> Xaa means Phe-NH<sub>2</sub>

&lt;400&gt; 4

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Xaa

5

10

15

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> Xaa means Phe-NH<sub>2</sub>

&lt;400&gt; 5

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

5

10

15

Val Gly Arg Xaa

20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> Xaa on the 1st position means Ac-Pro, Xaa on the 4th position means Tyr (Ac),  
and Xaa on the 15th position means Phe-NH<sub>2</sub>

&lt;400&gt; 6

Xaa Ala Trp Xaa Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Xaa

5

10

15

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

<223> Xaa means Phe-NH<sub>2</sub>

&lt;400&gt; 7

Cys Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Xaa

5

10

15

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bovine

&lt;400&gt; 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

20

25

30

Arg

<210> 9

<211> 31

<212> PRT

<213> Human

<223> Xaa means Phe-NH<sub>2</sub>

<400> 9

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

20

25

30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Human

<223> Xaa means Arg-NH<sub>2</sub>

<400> 10

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Xaa

20

25

30

<210> 11

**THIS PAGE BLANK (US**

<211> 14

<212> PRT

<213> Human

<223> Xaa means Cys-NH<sub>2</sub>

<400> 11

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Xaa

5

10

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Bovine

<223> Xaa means Phe-NH<sub>2</sub>

<400> 12

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

5

10

15

Val Gly Arg Xaa

20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Rat

<223> Xaa means Phe-NH<sub>2</sub>

<400> 13

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

5

10

15

Val Gly Arg Xaa

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

20

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02650

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/02, C12P21/08, G01N33/531

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/02, C12P21/08, G01N33/531

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 98/49295, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 5 November, 1998 (05. 11. 98), Claim 12 & JP, 11-9286, A	1-9
X	WO, 97/24436, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 10 July, 1997 (10. 07. 97), Claim 16 & EP, 870020, A1 & JP, 10-146192, A	1-9
PA	EP, 887417, A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 30 December, 1998 (30. 12. 98), Full text & JP, 11-71396	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
9 August, 1999 (09. 08. 99)

Date of mailing of the international search report  
17 August, 1999 (17. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl <sup>6</sup> C12N 15/02, C12P 21/08, G01N 33/531		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int.Cl <sup>6</sup> C12N 15/02, C12P 21/08, G01N 33/531		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 98/49295, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 5.11月.1998 (05.11.98) 請求項 1 2 & JP, 11-9286, A	1-9
X	WO, 97/24436, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 10.7月.1997 (10.07.97) 請求項 1 6 & EP, 870020, A1 & JP, 10-146192, A	1-9
PA	EP, 887417, A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 30.12月.1998 (30.12.98) 全文 & JP. 11-71396	1-9
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
09.08.99	17.08.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富水 みどり	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">             4 N 3 4 8 8           </div>
電話番号 03-3581-1101		内線 3488

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

13 T  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2523 WO0P	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/02650	International filing date (day/month/year) 20 May 1999 (20.05.99)	Priority date (day/month/year) 21 May 1998 (21.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/02, C12P 21/08, G01N 33/531		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 29 June 1999 (29.06.99)	Date of completion of this report 10 February 2000 (10.02.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02650

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02650

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations****Claims 1-9**

Document 1 [WO, 97/24436, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd., 10 July 1997 (10.07.97) Claim 16; Par. Nos. 0061 to 0067] describes the preparation of a hybridoma having the capability of producing a monoclonal antibody to the common receptor of a ligand polypeptide and a G-protein, the preparation of a monoclonal antibody to the common receptor of a ligand polypeptide and a G-protein, and quantitation of the common receptor of a ligand polypeptide and a G-protein by using that antibody.

The use of a polypeptide fragment of the common receptor of a ligand polypeptide and a G-protein as an antigen in the preparation of the above monoclonal antibody is obvious to persons skilled in the art, and the location and length of that fragment are matters to be established as needed by persons skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02650

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO, 98/49295, A1 E, X	05 November 1998 (05.11.1998)	27 April 1998 (27.04.1998)	28 April 1997 (28.04.1997)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 2523WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/02650	国際出願日 (日.月.年) 20.05.99	優先日 (日.月.年) 21.05.98
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☒ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/02, C12P 21/08, G01N 33/531

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/02, C12P 21/08, G01N 33/531

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), CA(STN), REGISTRY(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 98/49295, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 5. 11月. 1998 (05. 11. 98) 請求項 1 2 & JP, 11-9286, A	1-9
X	WO, 97/24436, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 10. 7月. 1997 (10. 07. 97) 請求項 1 6 & EP, 870020, A1 & JP, 10-146192, A	1-9
PA	EP, 887417, A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 30. 12月. 1998 (30. 12. 98) 全文 & JP. 11-71396	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 08. 99

国際調査報告の発送日

17.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり



4N

3488

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

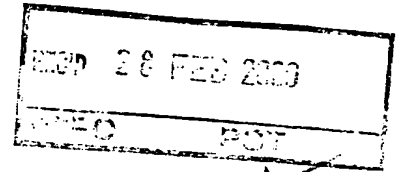


特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕



出願人又は代理人 の書類記号 2523WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/02650	国際出願日 (日.月.年) 20.05.99	優先日 (日.月.年) 21.05.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/02, C12P 21/08, G01N 33/531		
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input checked="" type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.06.99	国際予備審査報告を作成した日 10.02.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 N 9152

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                          |            |   |       |        |                       |
|--------------------------|------------|---|-------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
|                          | 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
|                          | 明細書        | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの           |
|                          | 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
|                          | 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
|                          | 請求の範囲      | 第 | _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> | 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの           |
|                          | 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
|                          | 図面         | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
|                          | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
|                          | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの  |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1 - 9	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1 - 9

文献1 : WO, 97/24436, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.) 10.7月. 1997

(10.07.97) 請求項 16、【0061】～【0067】

には、リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するモノクローナル抗体産生能を有するハイブリドーマを製造すること、リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するモノクローナル抗体を製造すること、及び該抗体を使用してリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターを定量することが記載されている。

上記モノクローナル抗体を製造する際の抗原として、リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質のペプチドフラグメントを使用することは、当業者にとって自明なことであり、そのフラグメントの位置及び長さも当業者であれば適宜設定しうることである。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 98/49295, AI E, X	05. 11. 98	27. 04. 98	28. 04. 97

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02650

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/02, C12P21/08, G01N33/531

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/02, C12P21/08, G01N33/531

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 98/49295, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 5 November, 1998 (05. 11. 98), Claim 12 & JP, 11-9286, A	1-9
X	WO, 97/24436, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 10 July, 1997 (10. 07. 97), Claim 16 & EP, 870020, A1 & JP, 10-146192, A	1-9
PA	EP, 887417, A2 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 30 December, 1998 (30. 12. 98), Full text & JP, 11-71396	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
9 August, 1999 (09. 08. 99)

Date of mailing of the international search report  
17 August, 1999 (17. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi  
Osaka Plant of Takeda Chemical  
Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome  
Yodogawa-ku  
Osaka-shi  
Osaka 532-0024  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 December 1999 (16.12.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference 2523WOOP	
International application No. PCT/JP99/02650	International filing date (day/month/year) 20 May 1999 (20.05.99)

1. The following indications appeared on record concerning:	
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor <input checked="" type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address	State of Nationality
	State of Residence
	Telephone No.
	Facsimile No.
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:	
<input checked="" type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence	
Name and Address TAKAHASHI, Shuichi Osaka Plant of Takeda Chemical Industries, Ltd. 17-85, Jusohonmachi 2-chome Yodogawa-ku Osaka-shi Osaka 532-0024 Japan	State of Nationality
	State of Residence
	Telephone No. 06-6300-6845
	Facsimile No. 06-6300-6601
3. Further observations, if necessary: The person in Box 2 have now been appointed as a sub-agent and should be added in the record.	
4. A copy of this notification has been sent to:	
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Susumu Kubo
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:  
25 November 1999 (25.11.99)

International application No.:  
PCT/JP99/02650

Applicant's or agent's file reference:  
2523WO0P

International filing date:  
20 May 1999 (20.05.99)

Priority date:  
21 May 1998 (21.05.98)

Applicant:  
MATSUMOTO, Hirokazu et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
29 June 1999 (29.06.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

